CIENCIA

Revista hispano-americana de Ciencias puras y aplicadas

PUBLICACION DEL

PATRONATO DE CIENCIA

SUMARIO

Págs.

EDITORIAL:

Bernardo A. Houssay, por J. PUCHE V

COMUNICACIONES ORIGINALES:

Hormonal factors on lipid metabolism in the Houssay's dog, por VIRGILIO G. FOGLIA, ALICIA G. ROLDÁN y ENRIQUE J. DEL CASTILLO 133

Resistencia al efecto de dosis sucesivas de aloxana producida por inyección de una dosis de la droga desprovista de efecto diabetógeno, por FRANCISCO GRANDE 139

Efecto reflejo de la insulina y regulación de la glucemia, por RAMÓN ALVAREZ-BUYLLA ... 143

Consideraciones sobre un circuito regulador de la ingestión de sodio, por MIGUEL R. COVIAN 149

Regulación neuroendocrina de la actividad diurna del acocil Procambarus, por HUGO ARÉCHIGA U. 155

El papel de AMP cíclico en la función sináptica, por ALEJANDRO BAYÓN CASO, VÍCTOR ALEMÁN ALEMÁN y JORGE MOLINA TORRES 163

NOTICIAS:

Semblanza del Dr. Carlos Casas Campillo, Premio Nacional de Ciencias 1973 (México), por ADOLFO PÉREZ-MIRAVETE 177

La Fundación Eugenio Rodríguez Pascual otorga al Doctor Francisco Grande Covián el Premio 1972, por J. PUCHE 179

Volumen XXVIII MEXICO, D. F. 1973 Número 4

CIENCIA

REVISTA HISPANO-AMERICANA DE CIENCIAS PURAS Y APLICADAS

DIRECTOR FUNDADOR
IGNACIO BOLIVAR Y URRUTIA †

DIRECTOR
CANDIDO BOLIVAR Y PIELTAIN

EDITOR
DIONISIO PELAEZ FERNANDEZ

CONSEJO EDITORIAL:
FRANCISCO GIRAL GONZALEZ JOSE PUCHE ALVAREZ JOSE IGNACIO BOLIVAR GOYANES

CONSEJO DE REDACCION

ALVAREZ FUERTES, DR. GABRIEL, México.
ARNÁIZ y FREG, DR. ARTURO. México.
ASENJO, DR. CONRADO F., San Juan, Puerto Rico.
BALL, DR. G. E. Edmonton, Canadá.
BAMBAREN, DR. CARLOS A., Lima, Perú.
BARGALLÓ, PROF. MODESTO. México.
BEIER, DR. MAX. Viena, Austria.
BELTRAN, DR. ENRIQUE. México.
BIRABEM, DR. MAX. Buenos Aires, Argentina.
BONET, DR. FEDERICO. México.
BOSCH GIMPERA, DR. PEDRO. México.
BRAVO-AHUJA, ING. VÍCTOR. México.
BUTTY, ING. ENRIQUE. Buenos Aires, Argentina.
CABALLERO, DR. EDUARDO. México
CABRERA, PROF. ANGEL LULIO. La Plata, Argentina.
CARBONELL, DR. CARLOS S., Montevideo, Uruguay.
CÁRDENAS, DR. MARTÍN. Cochabamba, Bolivia.
CASTAÑEDA-AGULLÓ, DR. MANUEL. México.
COLLAZO, DR. JUAN A. A. Montevideo, Uruguay.
COSTERO, DR. ISAAC. México.
CORI, PROF. OSWALDO. Santiago de Chile, Chile.
CORONADO-GUTIÉRREZ, Biól. LUZ. México.
CRUZ-COKE, DR. EDUARDO. Santiago de Chile, Chile.
CUATRECASAS, PROF. JOSÉ. Washington, D. C., EE. UU.
CHAGAS, DR. CARLOS. Río de Janeiro, Brasil.
DEULOFEU, DR. VENANCIO. Buenos Aires, Argentina.
ERDOS, ING. JOSÉ. México.
ESCUDERO, DR. PEDRO. Buenos Aires, Argentina.
ESPAÑOL, PROF. F. Barcelona, España.
ESTABLE, DR. CLEMENTE. Montevideo, Uruguay.
FLORKIN, PROF. MARCEL. Lieja, Bélgica.
FOLCH y PI, DR. ALBERTO, México.
FONSECA, DR. FLAVIO DA. São Paulo, Brasil.
GONÇALVES DE LIMA, DR. OSWALDO. Recife, Brasil.
GRAEF, DR. CARLOS, México.
GRANDE, DR. FRANCISCO, Minneapolis, Estados Unidos.
GUZMÁN, ING. EDUARDO J. México.
GUZMÁN BARRÓN, DR. A. Lima. Perú.
HAHN, DR. FEDERICO L. México.
HARO, DR. GUILLERMO, Tonantzintla, México.
HEIM, PROF. ROGER. París, Francia.
HENDRICHS, ING. JORGE. México.
HOFFSTETTER, DR. ROBERT. París, Francia.
HORMAECHE, DR. ESTENIO. Montevideo, Uruguay.
HUBBS, PROF. C. La Jolla, California, EE. UU.
IZQUIERDO, DR. JOSÉ JOAQUÍN. México.
KOPPISCH, DR. ENRIQUE. Puerto Rico.
LASNIER, DR. EUGENIO P. Montevideo, Uruguay.
LENT, DR. HERMAN. Río de Janeiro, Brasil.
LIPSCHUTZ, DR. ALEJANDRO. Santiago de Chile, Chile.
LUCO, DR. J. V. Santiago de Chile, Chile.
MACHADO, DR. ANTONIO DE B. Dundo, Angola.
MADRAZO GARAMENDI, QUÍM. MANUEL. México.
MARTÍNEZ, PROF. ANTONIO. Buenos Aires, Argentina.
MARTÍNEZ BÁEZ, DR. MANUEL. México.
MARTÍNEZ DURÁN, DR. CARLOS. Guatemala, Guatemala.
MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, PROF. FERNANDO. Montevideo.
MARTINS, PROF. THALES. São Paulo, Brasil.
MASSIEU HELGUERA, DR. GUILLERMO. México.
MEDINA PERALTA, ING. MANUEL, México.
NÈGRE, JACQUES, Versailles, Francia.
NIETO, DR. DIONISIO. México.
OCHOA, DR. SEVERO. Nueva York, Estados Unidos.
OGUETA, ING. EZEQUIEL, Buenos Aires, Argentina.
ORIAS, PROF. OSCAR. Córdoba, Argentina.
ORIOL ANGUERA, DR. ANTONIO. México.
OSORIO TAFALL, DR. B. F. Nicosia, Chipre.
PARODI, ING. LORENZO R. Buenos Aires, Argentina
PEREIRA, PROF. FRANCISCO S. São Paulo, Brasil.
PÉREZ VITORIA, DR. AUGUSTO. París, Francia.
PÉREZ MIRAVETE, DR. ADOLFO, México.
ROTGER VILLAPLANA, P. BERNARDO. Denver, Colo., EE. UU.
RUIZ CASTAÑEDA, DR. MAXIMILIANO. México.
RZEDOWSKI, DR. JORGE, México.
SÁNCHEZ-MARROQUÍN, DR. ALFREDO. México.
SANDOVAL, DR. ARMANDO M. México.
SANDOVAL VALLARTA, DR. MANUEL. México.
SOBERÓN, DR. GUILLERMO. México.
STRANEO, PROF. S. L. Milán, Italia.
TUXEN, DR. SÖREN L. Copenhague, Dinamarca.
VANDEL, DR. ALBERT, Moulis, Pyr., Francia.
VARELA, DR. GERARDO. México.
VIANA, DR. Buenos Aires, Argentina.
VILLELA, DR. G. Río de Janeiro, Brasil.
ZELEDON, PROF. RODRIGO, Costa Rica.

PATRONATO DE CIENCIA

PRESIDENTE
LIC. CARLOS PRIETO

VICEPRESIDENTE
DR. IGNACIO CHAVEZ

VOCALES
ING. GUSTAVO P. SERRANO DR. JORGE CARRANZA ING. RICARDO MONGES LOPEZ ING. LEON SALINAS
SR. EMILIO SUBERBIE DR. SALVADOR ZUBIRAN

CIENCIA

Revista hispano-americana de Ciencias puras y aplicadas

Volumen XXVIII | *Diciembre 1973* | Número 4

SUMARIO

Págs.

EDITORIAL:

Bernardo A. Houssay, por J. PUCHE V

COMUNICACIONES ORIGINALES:

Hormonal factors on lipid metabolism in the Houssay's dog, por VIRGILIO G. FOGLIA, ALICIA G. ROLDÁN y ENRIQUE J. DEL CASTILLO 133

Resistencia al efecto de dosis sucesivas de aloxana producida por inyección de una dosis de la droga desprovista de efecto diabetógeno, por FRANCISCO GRANDE 139

Efecto reflejo de la insulina y regulación de la glucemia, por RAMÓN ALVAREZ-BUYLLA ... 143

Consideraciones sobre un circuito regulador de la ingestión de sodio, por MIGUEL R. COVIAN 149

Regulación neuroendocrina de la actividad diurna del acocil Procambarus, por HUGO ARÉCHIGA U. 155

El papel del AMP cíclico en la función sinápitca, por ALEJANDRO BAYÓN CASO, VÍCTOR ALEMÁN ALEMÁN y JORGE MOLINA TORRES 163

NOTICIAS:

Semblanza del Dr. Carlos Casas Campillo, Premio Nacional de Ciencias 1973 (México), por ADOLFO PÉREZ-MIRAVETE 177

La Fundación Eugenio Rodríguez Pascual otorga al Doctor Francisco Grande Covián el Premio 1972, por J. PUCHE 179

CIENCIA

Revista hispano-americana de
Ciencias puras y aplicadas

Volume XXVIII — *December 1973* — Number 4

CONTENTS

Page

EDITORIAL:

Bernardo A. Houssay, by J. PUCHE V

ORIGINAL PAPERS:

Hormonal factors on lipid metabolism in the Houssay's dog, by VIRGILIO G. FOGLIA ALICIA G. ROLDAN & ENRIQUE J. DEL CASTILLO 133

Resistance against the action of consecutive doses of aloxane produced by injection of only one non-diabetogenic dose of the drug, by FRANCISCO GRANDE 139

Insulin reflex action and regulation of the blood sugar, by RAMON ALVAREZ-BUYLLA 143

On a regulatory circuit for sodium chloride intake, by MIGUEL R. COVIAN 149

Neurohormonal regulation of the diurnal activity in the crayfish Procambarus, by HUGO ARECHIGA U. 155

The role that play the cyclic AMP in the synaptic function, by ALEJANDRO BAYON CASO, VICTOR ALEMAN ALEMAN & JORGE MOLINA TORRES 163

NEWS:

Biographical sketch of Dr. Carlos Casas Campillo, 1973 National Reward in Sciences (Mexico), by ADOLFO PEREZ-MIRAVETE 177

The Eugenio Rodriguez Pascual Foundation grants the 1972 Reward to Doctor Francisco Grande Covian, by J. PUCHE 179



Bernardo A. Houssay
1887 - 1971

CIENCIA

REVISTA HISPANO-AMERICANA DE CIENCIAS PURAS Y APLICADAS

DIRECTOR FUNDADOR
IGNACIO BOLIVAR Y URRUTIA †

DIRECTOR
CANDIDO BOLIVAR Y PIELTAIN

EDITOR
DIONISIO PELAEZ FERNANDEZ

CONSEJO EDITORIAL
FRANCISCO GIRAL GONZALEZ JOSE PUCHE ALVAREZ JOSE IGNACIO BOLIVAR GOYANES

VOL. XXVIII
NUMERO 4

PUBLICACION TRIMESTRAL DEL
PATRONATO DE CIENCIA
CON LA AYUDA ECONOMICA DEL
CONSEJO NACIONAL DE
CIENCIA Y TECNOLOGIA

MEXICO, D. F.
PUBLICADO: 31 DE DICIEMBRE DE 1973

REGISTRADA COMO ARTICULO DE 2A. CLASE EN LA ADMINISTRACION DE CORREOS DE MEXICO, D. F. CON FECHA 24 DE OCTUBRE, 1946

Editorial

Bernardo A. Houssay

Hace algo más de dos años se extinguió la vida fecunda, pletórica de nobles quehaceres e inquietudes, de este sabio insigne. Murió voluntariamente arraigado en su tierra nativa, rodeado por el afecto y admiración de centenares de discípulos y colaboradores adictos, y también del respeto de sus conciudadanos.

Tal vez lo recuerden todavía con tono airado sus mezquinos detractores, los que, por indigencia mental, interrumpieron demagógicamente sus trabajos universitarios y sus labores científicas; aquellos petulantes que siguen adictos a mesiánicos arbitrismos.

El profesor Houssay honró, con su presencia, sus trabajos y su prestigio, el Consejo de Redacción de Ciencia *desde 1940. Fuera obligado, en estas circunstancias, esbozar una nota biográfica de nuestro ilustre colaborador, pero, este homenaje fue realizado cumplidamente y en tiempo oportuno por Foglia, Leloir y Lewis[1] por Foglia[2] y por Covian[3]. El maestro Cannon[4] lo recordó con sincero afecto en los momentos adversos, a los que nos hemos referido.*

Los lineamientos más destacados de la labor de los fisiólogos de la Argentina los glosó el propio D. Bernardo[5], al comentar, con su precisión acostumbrada, los meritísimos trabajos desarrollados por un núcleo muy activo de sus discípulos y colaboradores en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires. De sus 135 componentes, no menos de 50 tuvieron a su cargo trabajos de investigación original. Los siete departamentos que funcionaban en el Instituto produjeron (hasta 1953), 1235 publicaciones en periódicos, libros y revistas especializadas de la Argentina y de otros países de América y de Europa.

Houssay coincide en algunos aspectos con Ramón y Cajal[6], proclamando la necesidad de educar a los investigadores en la formación de criterios independientes que puedan confrontar con opiniones más autorizadas, pero sin dejarse anular por el criterio ajeno, aunque sea prestigioso y respetable. Esta confrontación, cuando se realiza de manera sumisa o tomando exclusivamente modelos y fuentes extranjeras, suele llevar al servilismo intelectual, agostando toda iniciativa.

La labor que venía desarrollando en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina tuvo que ser continuada en una nueva Institución privada, el Instituto de Biología y Medicina Experimental, actualmente bajo la dirección del Prof. Virgilio G. Foglia.

Entre los programas de investigación seguidos por Houssay y su escuela destacan, por la ri-

queza de sus observaciones y la trascendencia de los resultados obtenidos, los referentes a la fisiología de la hipófisis. Sus primeras investigaciones acerca de la fisiología de la hipófisis de la rana aparecen en 1910. En 1911 publica su tesis doctoral[7] y unos años después (1918) incorpora al contexto original más de 40 nuevas aportaciones experimentales sobre el mismo tema. Este copioso venero de conocimientos confluye después con los trabajos que investigan la fisiología y la patología de la diabetes experimental. El desarrollo sistemático de estas líneas de investigación le llevan a compartir con los Cori el Premio Nobel de Medicina y Fisiología de 1947.

Houssay siguió con evidente simpatía el ejemplo de D. Santiago Ramón y Cajal. Precisamente en los primeros años de su actividad docente se advierte la influencia que produjo en la Argentina el discurso famoso[6] y la monografía sobre "Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso"[8] editada por suscripción entre médicos argentinos de origen español. Cl. Bernard es, indudablemente, el modelo que encuentra mas afín e imprime calidades y estilo en la obra y en el pensamiento de Houssay. Otro fisiólogo ilustre, Augusto Pi Suñer, influye en el destino de Houssay. Fue con motivo de un curso de conferencias profesado en la Cátedra Ramón y Cajal en la Facultad de Medicina de Buenos Aires (1919). Este curso coincidió con los trámites preceptivos para la designación de profesor titular de Fisiología por el Consejo de la Facultad de Medicina. El Decano D. Alfredo Lanari tuvo que decidir la votación. Seguramente entre los elementos de juicio determinantes hubo ocasión de conocer la opinión que merecían los candidatos al profesor invitado y esta opinión fue coincidente con la decisión en favor del mejor de ellos, D. Bernardo Houssay.

El acceso a la cátedra de Fisiología y luego la organización del Instituto, cambió radicalmente las perspectivas científicas en la Argentina. Así como Ludwig (1816-1895) convirtiera el Instituto de Fisiología de Leipzig en el centro propulsor de la investigación fisiológica hacia Europa y América, Houssay, medio siglo después 1887-1971) realizó idéntica tarea en los países de habla española. Al igual que Ludwig, Houssay compartió liberal y generosamente, con sus discípulos, las primicias y la gloria de sus descubrimientos.

Esperemos que este recuerdo del maestro Houssay sirva de ejemplo para quienes asuman la dirección del cultivo de la ciencia en los pueblos de habla hispánica.

1. Leloir, L. F., Foglia, V. G. y Lewis. J. T., Homenaje al Dr. Bernardo A. Houssay. Informaciones del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Buenos Aires, Octubre 1971.
2. Foglia, V. G., Bernardo Alberto Houssay. *Acta Physiol. Latinoamericana*, **21**, 267-285 (1971).
3. Covian, M., Bernardo Alberto Houssay. *Physiology and Behavior*, **8**, 389 (1972).
4. Cannon, W. B., The way of an investigator. W. W. Norton Co. New York, 181-182, 1945.
5. Houssay, B. A., Perspectives in physiology. An International Symposium. Ilza Veith, Ed. Washington, 1954.
6. Ramón y Cajal, Santiago. Reglas y consejos para la investigación científica. 3a. Ed. Madrid, 1912.
7. Houssay, B. A., Estudios sobre la acción fisiológica de los extractos hipofisarios. Tesis doctoral, premiada por la Facultad de Ciencias Médicas, Buenos Aires, 1911.
8. Ramón y Cajal, Santiago. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Imprenta de Hijos de Nicolás Moya, Madrid, 1913.
9. Pi y Suñer, A., La unidad funcional, Monografías Médicas "Balmis" Cía. General Ed. México, D. F., 1944.

México, D. F., 31 de Diciembre de 1973

José Puche Alvarez

CIENCIA, MÉX.
XXVIII (4) 133-37
31, Diciembre, 1973

Comunicaciones originales

HORMONAL FACTORS ON LIPID METABOLISM IN THE HOUSSAY'S DOG

Virgilio G. Foglia, Alicia G. Roldán y Enrique J. del Castillo

Instituto de Biología y Medicina Experimental
Obligado 2490, Buenos Aires,
Argentina

Resumen

La cetosis diabética de los perros pancrectomizados depende de la carencia insulínica, hállase influida por la hipófisis y las suprarrenales (o por las hormonas contenidas en ellas). En los perros pancrectomizados la cetonemia aumenta, hasta 8 veces el valor normal, 5 días después de la operación. En estos animales la hipofisectomía, "perros Houssay" normaliza el contenido de acetona en la sangre. La administración conjunta de somatotrofina y cortisol produce en los "perros Houssay" hipercetonemia e infiltración grasa del hígado. Consecutivamente a la pancrectomía se observa aumento de grasa hepática (8 veces) que no vuelve a la normalidad después de la hipofisectomía. El contenido lípido del hígado en los "perros Houssay" es 3 veces mas alto que el del hígado normal. Incubando cortes de hígado, de animales normales, pancrectomizados y perros Houssay —sin agregar substrato— se observa producción de cuerpos cetónicos sólo en los pancrectomizados, manteniéndose sin variación la cetogenesis hepática en los cortes de hígado normales y en los procedentes de "perros Houssay". La producción de cuerpos cetónicos en el hígado de los "perros Houssay" no se altera a pesar del alto contenido de lípidos, hecho que puede atribuirse a la disminución del contenido de AMPc hepático, pues, adicionando nucleótido al medio de incubación, aumenta la cetogénesis de 8 μg/100 mg a 21 μg/100 mg. La inyección de somatotrofina a los "perros Houssay" aumenta la cetogénesis a valores cercanos a los que presentan los animales pancrectomizados. De estos resultados podemos inducir que la hipofisectomía evita la hipercetonemia en los animales diabéticos, disminuyendo la hidrólisis de grasa del tejido adiposo, lo mismo que la lipólisis en el hígado y, además, que la somatotrofina interviene de manera muy importante este proceso.

Summary

The production of diabetic ketosis in pancreatectomized dogs is dependent of lack of insulin and simultaneous presence of the hypophysis and adrenal glands (or their hormones). The ketonemia of normal dogs increases 8 times after 5 days of pancreatectomy and it is normalized with hypophysectomy (Houssay's dogs). The association of somatotrophin and cortisól induce intense hyperketonemia and fatty liver in the Houssay's dogs. After pancreatectomy also there is a striking increase of liver fat (8 times) which is not normalized by hypophysectomy; the liver lipids content in Houssay's dogs is 3 times higher that in normal livers. When liver slices of normal pancreatectomized and Houssay's dogs are incubated without exogenous substrate there is a high ketone body production by liver of diabetic animals, since is normal the ketogenesis of liver from normal and Houssay's dogs. The normalization of ketone body production from liver of Houssay's dogs, although the high liver lipids content, can be explained by a diminishing level of cAMP of the liver; since the addition of the nucleotide to the incubation medium increase the ketogenesis from 8 μg/100 mg to 21 μg/100 mg. The injection of somatotrophin to Houssay's dogs increases ketone body production to a similar values of diabetic animals. All these results would indicate that hypophysectomy prevents hyperketonemia in diabetic animals not only by decreasing hydrolysis of fat in adipose tissue but also by decreasing its lipolysis in the liver, and that somatotrophin has a very important function in this process.

General consideration

It is known that hypophysectomy produces a striking attenuation in pancreatic diabetes. The attenuation is observed in 1) carbohydrate metabolism by a decrease in hyperglycemia and glycosuria; 2) protein metabolism: gluconeogenesis and urinary nitrogen is diminished; 3)

lipid metabolism: decreases FFA (free fatty acids) mobilization and as a consequence FFA and ketone bodies in blood and urine; also lowers the triglycerides in blood and in liver.

The hypophysis action on carbohydrate metabolism in diabetic animals is well-known (Altszuler *et al.*, 1968) but it has a striking effect on fatty metabolism. In Houssay's dogs the high lipolysis of triglycerides in adipose tissue and FFA levels in blood is partially attenuated but there is a total normalization on ketonemia (Roldán *et al.*, 1972). This attenuation on ketosis was discovered by Rietti (1930, 1932) in the pancreatectomized-hypophysectomized dogs (Houssay's dogs) studied by Houssay and Biasotti (1930). He found also the same attenuation in dogs with phlorhidzin diabetes.

Previous experiments in our laboratory (Urgoiti *et al.*, 1963; Houssay, 1964) have demonstrated that the production of diabetic ketosis in pancreatectomized dogs is dependent on two main factors: 1) lack of insulin; 2) simultaneous presence of the hypophysis and the adrenal glands (or their hormones). The presence of only one of these glands (or its hormones) is not enough; both of them must be present in the dog for the diabetic ketosis to occur.

Ketonemia in diabetes

Hyperketonemia in diabetes results from overproduction of ketone bodies and is associated with elevated levels of plasma (FFA) and high lipid content in the liver (Bressler, 1963). FFA taken up by the liver can be esterified into triglycerides or phospholipids and released as lipoproteins or catabolized by oxidation to CO^2 or ketone bodies (Mayes, and Felts, 1967; Ontko, 1972).

The ketonemia of normal dogs is 3.2 mg/100 ml (average of 22 animals). This value increases to 24 mg/100 ml (average 12 dogs) after 5 days of pancreatectomy. The previous hypophysectomy to pancreatectomized dogs (Houssay's

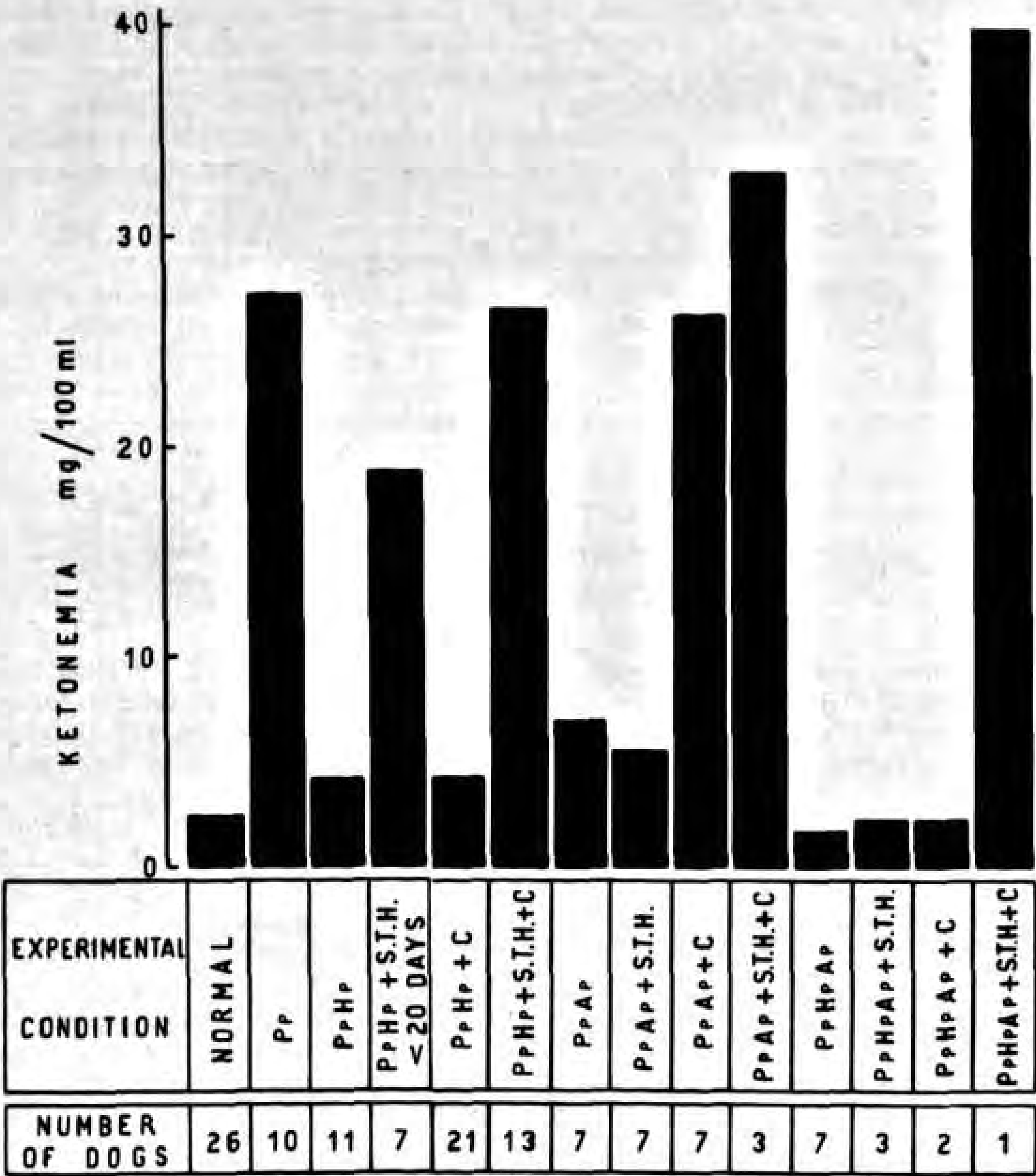


Fig. 1. Blood ketone bodies (mg/100 ml) in: pancreatectomized (P_p), Houssay's dogs (P_pH_p), Houssay's dogs + somatotropin (P_pH_p+STH), Houssay's dogs + cortisol (P_pH_p+C, pancreatectomized-adrenalectomized (P_pA_p), pancreatectomized-adrenalectomized + cortisol (P_pA_p+C), pancreatectomized-adrenalectomized + somatotropin + (P_pA_p+STH+C), pancreatectomized-adrenalectomized-hypophysectomized ($P_pH_pA_p$), pancreatectomized-hypophysectomized-adrenalectomized + somatotropin + cortisol ($P_pH_pA_p$+STH+C).

dogs) normalized the ketonemia 4.0 mg/100 ml (average 11 dogs).

As it can be seen in Fig. 1 in pancreatectomized dogs hyperketonemia was almost attenuated by adrenalectomy.

Somatotropin (STH) increases ketonemia in the Houssay's dogs but it has no action in pancreatectomized-adrenalectomized or in pancreatectomized-hypophysectomized-adrenalectomized animals. This fact shows that the adrenal glands are necessary, besides hypophysis, for the production of hyperketonemia.

In Houssay's dogs cortisol alone cannot reestablish the hyperketosis, due to the absence of the hypophysis but restores the high ketone bodies levels in blood in pancreatectomized-adrenalectomized dogs which had their own hypophysis.

Association of both hormones (*somatotropin* and cortisol) induce intense diabetic hyperketonemia in the experimental groups (Houssay's dogs, pancreatectomized-adrenalectomized and pancreatectomized-adrenalectomized-hypophysectomized). The association replaced the lack of hypophysis or adrenals (or their hormones). In all cases the extreme increase of ketonemia endangered the lives of the animals and killed most of them.

The blood FFA increased by pancreatectomy and decreased with a previous hypophysectomy as it is shown in Table I, while total lipids and cholesterol do not change.

TABLE I

Blood changes in dogs: normal (N); hypophysectomized (H_p); Houssay's dogs (P_pH_p); pancreatectomized (P_p) and Houssay's dogs + somatotropin (P_pH_p+STH). Between brackets number of dogs.

Dogs	N (22)	H_p (22)	P_pH_p (11)	P_p (12)	P_pH_p + STH (4)
Glycemia mg/100 ml	73 ± 0.2	60 ± 1.2	161 ± 33	275 ± 10	233 ± 10
F.F.A. μEq/l	480 ± 22	350 ± 36	632 ± 107	1880 ± 152	1628 ± 160
Ketone bodies mg/100 ml	3.2 ± 0.3	4.0 ± 0.5	4.0 ± 2.0	24.0 ± 2.8	10.1 ± 3.1
Total lipids mg/100 ml	419 ± 52	424 ± 32	554 ± 93	854 ± 182	768 ± 148
Cholesterol mg/100	92 ± 7	83 ± 7	121 ± 14	156 ± 11	114 ± 11

FATTY LIVER

After pancreatectomy there is a striking increase of liver fat, and a macro and microscopical aspect of a fatty liver.

The value in normal dogs is 3.5 g/100 g of total lipids; after pancreatectomy the increase is 8 times higher 25.0 g/100 g; previous hypophysectomy diminishes this increase but does not

TABLE II

Changes of liver composition in dogs: normal (N); pancreatectomized (P_p); Houssay's dogs (P_rH_p); hipophysectomized (H_p) and Houssay's dogs + somatotropin (P_pH_p + STH). Between brackets number of dogs

Dogs	F.F.A. μEq/l	Total lipids g/100 g	Triglycerides g/100 g	Phospholipids g/100 g
N (6)	5.6 ± 1.0	3.5 ± 0.5	2.0 ± 0.5	1.0 ± 0.5
P_p (9)	5.0 ± 0.5	25.4 ± 3.6	23.2 ± 3.6	2.0 ± 0.2
P_pH_p (6)	4.1 ± 0.2	10.0 ± 2.1	7.9 ± 2.2	2.3 ± 0.1
H_p (6)	4.1 ± 0.7	2.7 ± 0.4	1.2 ± 0.2	1.8 ± 0.2
P_pH_p + STH (4)	6.3 ± 0.2	18.4 ± 2.3	16.1 ± 2.2	1.9 ± 0.3

normalize the liver lipids content; the average is 10.0 g/100 g.

The increase of fat is due to triglycerides since phospholipids and FFA remained unchanged in all groups (Table II).

In Houssay's dogs the injection of somatotropin produces a marked increase of liver fat 18 g/100 g.

The fatty liver in P_p dogs can be the result of the large increase in plasma FFA produced by some hypophyseal hormones since the liver lipid content is mostly dependent on FFA taken up by the organ and not on triglyceride uptake (Higgins, and Green, 1967).

On the other hand we cannot use the same explanation for the high liver lipid content in Houssay's dogs since the levels of plasma FFA are lower, a decrease in lipid mobilization and or less lipolysis of liver triglycerides can be the reason of their acumulation. A direct relationship between total liver lipids and blood ketone bodies is seen in normal H_p and P_p dogs. Similar results were obtained by Scow and Chernick (1960) in rats; but in our Houssay's dogs blood ketone bodies are mostly independent of liver lipid content as they are normal while the latter is significantly higher.

Ketogenesis in Houssay's dogs

When liver slices from P_p animals are incubated without exogenous sustrate during 60 minutes there is a high ketone body production. This phenomenon is due to the increase level of cAMP produced by the absence of insulin because propranolol (a drug that prevents synthesis of cAMP) decreases ketogenesis in these livers (Table III). The hyperketogenesis is also lower by hypophysectomy as is demonstrated in our results (Fig. 2).

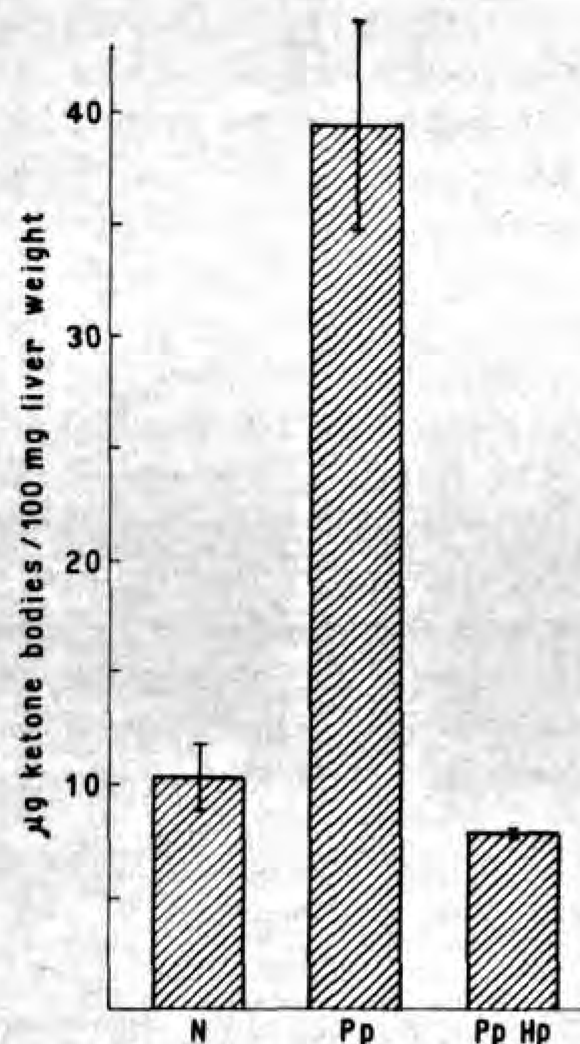


Fig. 2. Net ketone body production by liver homogenates of normal (N), pancreatectomized (P_p) and Houssay's dogs (P_pH_p) during 60 minutes of incubation.

The normalization of ketone body production from liver Houssay's dogs can be explained by a diminishing cAMP content of the liver, since the addition of the nucleotide to the incubation medium induces an increase of ketone body production by the liver of normal and Houssay's animals (Table III). This increase is significantly higher in the latter.

The injection of 1 mg/Kg of somatotropin during two days increases ketone body production by the liver of Houssay's dogs to a similar value to that in P_p animals and propanolol attenuated it, as in diabetic dogs (Table III).

All these results indicate that hypophysectomy prevents hyperketonemia in diabetic animals

Table III

Effect of cAMP on ketone body production (µg/100 mg of tissue weight) by liver homogenates from normal (N) and Houssay's dogs (P_pH_p) and of propranolol by liver slices from pancreatectomized (P_p) and Houssay's dogs + somatotropin (P_pH_p+ STH). Between brackets number of dogs.

Dogs	Control	10^{-4} M cAMP	10^{-4} M propanolol	Change from control	P
N (5)	10.45 ± 1.30	15.70 ± 1.69	—	5.25 ± 1.15	<0.05
P_pH_p (5)	7.92 ± 0.90	20.95 ± 0.98	—	13.1 ± 0.47	<0.0001
P_p (4)	29.15 ± 5.12	—	15.47 ± 3.40	—13.67 ± 2.14	<0.01
P_pH_p + STH (4)	30.50 ± 2.53	—	17.47 ± 3.02	—12.73 ± 1.82	<0.01

not only by decreasing plasma FFA by lowing hydrolysis of triglycerides in adipose tissue but also by decreasing its liposis in the liver, moreover that somatotropin has a very important function in this process. One of the possible regulating factor in this mechanism would be the levels of cAMP in the liver just as it is in the adipose tissue.

Conclusions

Some hypophyseal hormones, including: adrenocorticotropin, somatotropin, melanotropin, thyrotropin and many polypeptides (lipotropin of Anselmino and Hoffmann, and lipotropin of Li *et al.*, lipid mobilizing factor of Trygstad) have a lipolytic action "in vivo" and "in vitro" and increase ketonemia.

In adipose tissue of diabetic animals, triglycerides lipolysis is observed "in vivo". The high FFA produced increase their levels in blood where a part of them are taken up by some tissues and the other part are esterified or oxidized in the liver to CO_2 or ketone bodies.

Brain, heart and muscle (among others) use ketone bodies as a fuel but when in the liver there is a very ketone body production, as in diabetes, an accumulation in the blood (hiperketonemia) and in the urine (hyperketonuria) is observed.

The diabetic ketosis of the pancreatectomized animals is due to two factors: 1) lack of insulin; 2) simultaneous presence of the hormones of the hypophysis and adrenal glands. Due to these factors there is an increase of lipolysis of triglycerides increasing FFA and as a consequence hyperketonemia is produced.

The hormonal mediator in the case of the hypophysis is cAMP which activates the lipase of adipose tissue and liver.

References

ALTSZULER, N. I., RATHGEB, I., WINKLER, B.: The efects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism in the dog. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **148:** 441 (1968).

ANSELMINO, K. J., HOFFMAN, F.: The fat-metabolism hormone of the anterior pituitary (Lipotropin). *Dt. med. Wschr.*, **90:** 39 (1965).

BRESSLER, R.: The biochemistry of ketosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **104:** 735 (1963).

HIGGINS, J. A., GREEN, C.: Properties of lipase of rat-liver parenchymal cells. *Bioch. biophy. Acta*, **144:** 211 (1967).

HOUSSAY, B. A.: Hormonal factors of diabetic ketosis. Banting lecture of the American Diabetes Association, Atlantic City, June 15, 1963. *Diabetes*, **12:** 481 (1963).

HOUSSAY, B. A., BIASOTTI, A.: La diabetes pancreática de los perros hipofisoprivos. *Rev. Soc. argent. Biol.*, **6:** 251 (1930). Le diabete pancréatique des chiens hypophysectomises. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, París, **105:** 121 (1930). Les troubles diabétiques chez les chiens privés d'hypophyse et de pancréas. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, París, **105:** 124, (1930). Pankreasdiabete und Hypophyse beim Hund Plüng *Arch. ges. Physiol.*, **227:** 664 (1931).

LI, CH. H.: Current concept on the chemical biology of pituitary hormones. *Perspect. Biol. Med.*, **11:** 498 (1968).

LI, CH. C., BARNAFI, L., CHRÉTIEN, M., CHUNG, D.: Isolation and amino-acid sequence of β-LPH from sheep pituitary glands. *Nature* (Lond.), **208:** 1093 (1965).

MAYES, P. A., FELTS, J. M.: Regulation of metabolism in the liver. *Nature* (Lond.) **215:** 716 (1967).

ONTKO, J. A.: Metabolism of free fatty acid in isolated liver cells. Factors affecting the partition between esterification and oxidation. *J. biol. Chem.*, **247:** 1788 (1972).

RIETTI, C. T.: Cetosis en la diabetes pancreática de los perros hipofisoprivos. Act. Congr. int Biol., Montevideo Oct. 1930. *Arch. Soc. Biol.*, Montevideo, **931**, sup. 332.

RIETTI, C. T.: Ketosis in the pancreatic and Phlorhizin diabetes of hypophysectomized dogs. *J. Physiol.* (Lond.) **77:** 92 (1932).

ROLDÁN, A. G., del CASTILLO, E. J., RIETTI, C. T.: The effect of hypophysectomy on ketonemia and liver lipids in pancreatectomized dogs. *Acta physiol. latinoam.*, **22:** 166 (1972).

TRYGSTAD, O., FOSS, I.: The lipid-mobilizing effect of some pituitary gland preparations. IV. Sub-division of human growth hormone preparation into a somatotrophic and adipokinetic-hyperglycaemic agent. *Acta Endoc.* (Copenh.) **58:** 295 (1968).

URGOITI, E. J., HOUSSAY, B. A., RIETTI, C. T.: Hipophyseal and adrenal factors essential for ketoacidosis of pancreatectomized dogs. *Diabetes*, **12:** 301 (1963).

CIENCIA, MÉX.
XXVIII (4) 139-42
31, Diciembre, 1973

RESISTENCIA AL EFECTO DE DOSIS SUCESIVAS DE ALOXANA PRODUCIDA POR INYECCION DE UNA DOSIS DE LA DROGA DESPROVISTA DE EFECTO DIABETOGENO

FRANCISCO GRANDE

Jay Phyllips Research Laboratory, Mount Sinai Hospital y Laboratorio de Higiene Fisiológica, Universidad de Minnesota, Minneapolis, Minnesota, E.U.A.

RESUMEN

La inyección de solución de aloxana en perros, a dosis no diabetógenas, confiere a los animales tratados efecto protector para dosis, letales y diabetógenas, consecutivas. La acción protectora se manifiesta más claramente sobre los efectos letales que sobre los diabetógenos. El efecto protector deja de producirse cuando la dosis inicial se administra en animales con los pedículos renales pinzados durante la inyección y los 10 minutos siguientes. La protección para las dosis no diabetógenas es relativa y deja de manifestarse en los tratados y en los no tratados previamente cuando las dosis inyectadas son muy elevadas (90 mg/Kg). La acción protectora debe relacionarse con el funcionamiento renal, pues los perros tratados previamente no presentan los efectos uremiantes que aparecen en los no tratados.

SUMMARY

The injection of aloxane solution to dogs, at non-diabetogenic doses, confers to the animal treated so a protective effect against consecutive doses, both lethal and diabetogenic. This protective action is more clearly shown upon the lethal than diabetogenic effects. The protective effects cease to be produced when the initial dose is administered to animals in which the renal pedicles are tweezered during the injection and through the following ten minutes. The protection against non-diabetogenic doses is relative and ceases in both treated and non-treated animals when the injected doses are very high (90 mg/Kg). The protective action ought to be related to the renal functioning because the previously treated dogs not show the uremic effects that appear in the non-treated ones.

Aunque hace ya muchos años que describimos la acción protectora de una primera dosis de aloxana frente al efecto de dosis sucesivas de la misma (Oya y Grande, 1945 y 1947), este fenómeno ha recibido poca atención en la literatura y es frecuente encontrar en ella referencias al empleo de dosis repetidas de esta substancia. Así, en un reciente artículo destinado a examinar los problemas que se encuentran al tratar de producir diabetes aloxánica en el perro, Pemberton y Manax (1970) describen la administración de dosis repetidas de aloxana al mismo animal. Los autores, sin embargo, no hacen comentario alguno acerca del desarrollo de resistencia a la droga, a pesar de que los incompletos datos presentados parecen indicar considerable tolerancia en los animales tratados con dosis repetidas.

Nuestros primeros estudios sobre la resistencia a la aloxana fueron realizados en perros que habían desarrollado diabetes después de la primera inyección de aloxana; pero; cuya diabetes había remitido espontáneamente y eran considerados normales en el momento de recibir la segunda inyección, o en perros con diabetes aloxánica activa.

Todos estos animales habían recibido una primera dosis de aloxana relativamente elevada y, por ello, nos pareció de interés investigar si el fenómeno de la resistencia se produce también por la administración de una dosis inicial mínima de aloxana, desprovista de efecto diabetógeno.

Los datos preliminares que presentamos en esta comunicación proceden de un extenso estudio realizado en nuestro laboratorio, con la colaboración de los Drs. S. Sethi y M. de Oya, acerca del efecto diabetógeno de distintas dosis de aloxana en perros normales alimentados con la misma dieta. La presente comunicación se limita a describir los resultados obtenidos en un grupo de perros normales, inyectados inicial-

mente con dosis de 35 mg de aloxana/Kg, que recibieron dosis sucesivas crecientes de la misma substancia y a comparar la respuesta de estos animales con la de animales inyectados simultáneamente con dosis iguales de aloxana y que la recibían por primera vez.

Métodos

Los perros empleados en estos experimentos fueron mantenidos en jaulas individuales, en una habitación con aire acondicionado a temperatura constante (22°) y fueron alimentados *ad libitum* con la misma dieta comercial (Kibbies, Morton Dog Food Co., Minneapolis, Minn.) durante no menos de dos semanas antes de practicar la inyección. Todos los animales presentaban glucemia normal en el momento de la inyección.

Las inyecciones de aloxana se practicaron de 16 a 18 horas después de ayuno en forma de solución al 3% en solución salina (0.9%). La solución de aloxana se inyectó por vía intravenosa y las soluciones fueron preparadas a diario, inmediateamente antes de la inyección.

Muestras de sangre para la determinación de glucosa y urea fueron obtenidas en los días siguientes a la inyección, siempre en ayunas. Se consideró que los perros habían desarrollado diabetes aloxánica cuando el nivel glucémico era superior a 150 mg/100 ml a partir de las 48 horas después de la inyección.

Las determinaciones de glucemia se realizaron utilizando la modificación colorimétrica de Nelson al método de Somogyi (1944) y las determinaciones de urea por el método de Michon y Arnaud (1962). Las cifras de urea se expresan en términos de nitrógeno uréico por 100 ml de plasma.

Resultados

Cada uno de los animales de un grupo de 8 perros normales fue tratado con una primera dosis de aloxana de 35 mg/Kg. Esta dosis no tuvo efecto diabetógeno en ninguno de los animales. La glucemia media en ayuno antes de la inyección de aloxana era 65 mg/100 ml (E.S. ± 1.8) y 68 mg/100 ml (E.S. ± 3.9) a las 48 horas de la inyección. Todos los animales sobrevivieron a la inyección.

Tres días más tarde los 8 perros fueron inyectados con dosis de 50 mg de aloxana/Kg, que tampoco tuvo efecto diabetógeno en estos animales. La glucemia media antes de la inyección era 68 mg/100 ml (E.S. ± 3.9) y de 88 mg/100 ml (E.S. ± 11.0) a las 48 horas de la inyección. Ninguno de los animales mostró glucemia superior a 150 mg/100 ml después de la inyección y todos ellos sobrevivieron. En contraste, la mis-

Tabla I

Comparación del efecto de dosis de Aloxana de 65, 75 y 90 ml/Kg en perros previamente tratados y en perros no previamente tratados

	Dosis de Aloxana, mg/Kg		
	65	75	90
Perros previamente tratados			
Número de perros	7	7	7
Supervivientes	7	7	4
Muertos	0	0	3
Glucemia, mg/100 ml (a)			
Antes de la inyección	102 ± 18	122 ± 31	115 ± 30
48 horas después de inyección	96 ± 27	107 ± 22	216 ± 71
Animales diabéticos (b)	1	1	3
Perros no tratados previamente			
Número de perros	6	6	6
Supervivientes	1	0	0
Muertos	5	6	6
Glucemia, mg/100 ml (a)			
Antes de la inyección	68 ± 4	85 ± 5	71 ± 3
48 horas después de inyección	121 ± 14	249 ± 62	239 ± 64
Animales diabéticos (b)	1	3	3
Diferencia en mortalidad			
X^2 (c)	6.3	9.3	2.6
p	0.013	0.002	0.11

(a). Medias ± Error estandar de la media.
(b). Se consideraron diabéticos aquellos animales cuya glucemia fue superior a 150 mg/100 ml a las 48 horas de la inyección.
(c). Corregido según Yates.

ma dosis de aloxana (50 mg/Kg) inyectada a 11 perros testigo (no previamente tratados con aloxana) mostró evidente efecto diabetógeno. La glucemia media de estos 11 perros era 78 mg/100 ml (E.S. ± 2.2.) antes de la inyección y ascendió a 322 mg/100 ml (E.S. ± 94.3) a las 48 horas de la inyección. Cinco de los animales desarrollaron diabetes (glucemia por encima de 150 mg/100 ml, a partir de las 48 horas de la inyección) y siete murieron entre los días 9 y 24 siguientes a la inyección. La diferencia de mortalidad entre los dos grupos de animales, analizada mediante la prueba de X^2, fue estadísticamente significativa ($p<0.01$).

Tres semanas después de la inyección de 50 mg/Kg de aloxana, 7 de los perros que habían recibido inicialmente la dosis de 35 mg/Kg fueron inyectados con dosis de 65 mg/Kg. Esta dosis fue administrada simultáneamente a otros seis perros normales no previamente tratados con aloxana. El experimento fue repetido dos semanas más tarde, usando dosis de 75 mg/Kg, y otras dos semanas después, con la dosis de 90 mg/Kg. Estas mismas dosis fueron inyectadas en los días correspondientes a perros no previamente tratados, empleando 6 animales cada vez. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla I.

El análisis estadístico presentado en la Tabla I muestra que los animales que habían sido tratados inicialmente con dosis de 35 mg de aloxana/Kg, presentaron una tolerancia al afecto letal de la aloxana significativamente mayor que la de los perros tratados por primera vez, para las dosis de 65 y 75 mg/Kg. La diferencia no fue, en cambio, significativa para la dosis de 90 mg/Kg. En contraste, las diferencias en efecto diabetógeno no fueron significativas para ninguna de las tres dosis. Estos datos demuestran que los animales inicialmente tratados con 35 mg de aloxana/Kg adquieren una resistencia relativa al efecto letal de la droga; pero no a su efecto diabetógeno.

Puesto que el efecto letal de la aloxana parece deberse principalmente al desarrollo de uremia consecutiva a la lesión renal producida por esta substancia, llevamos a cabo la determinación del nitrógeno ureico del plasma en los animales tratados con la dosis de 75 mg/Kg. La Tabla II contiene los datos de cuatro de los animales inyectados con esta dosis por primera

TABLA II

EFECTO DE LA INYECCIÓN DE ALOXANA (75 ML/100 ML) SOBRE EL NITRÓGENO UREICO DEL PLASMA, EN PERROS PREVIAMENTE TRATADOS CON ALOXANA Y EN PERROS INYECTADOS POR PRIMERA VEZ

	Antes de la inyección	*Días después de la inyección* 1	2	3	6	7	8	9
		mg de nitrógeno ureico por 100 ml de plasma						
Perros no tratados previamente								
# 3693	19	28	30	53	65	152	*	
# 3707	15	30	44	47	50	126	*	
# 3708	20	64	114	172	*			
# 3709	20	40	70	108	—	178	*	
Perros tratados previamente								
Media (7 perros)	19	26	30	30	30	31	33	30
Error estandar de la media	± 0.7	± 1.8	± 2.9	± 3.7	± 3.1	± 3.6	± 2.1	± 2.2

* Denota el día de la muerte del animal.

vez y la media de los valores obtenidos en los 7 perros inicialmente tratados con 35 mg/Kg. Puede verse que los cuatro perros que recibieron aloxana por primera vez mostraron marcada elevación de la cifra de nitrógeno ureico. Los perros tratados inicialmente con 35 mg/Kg, en cambio, mostraron sólo una mínima elevación de nitrógeno ureico y, como muestra la Tabla I, sobrevivieron a la inyección.

DISCUSIÓN

Los datos que preceden confirman nuestras observaciones anteriores (Oya y Grande, 1945, 1947) acerca del efecto protector de una primera dosis de aloxana frente a la administración de dosis sucesivas crecientes de la misma. Los resultados presentados en esta comunicación demuestran, además, que el efecto protector puede

obtenerse con dosis mínimas de aloxana, desprovistas de efecto diabetógeno e inferiores a las empleadas en nuestros estudios anteriores.

Los datos presentados en la Tabla I indican, también, que la protección producida por la dosis inicial de aloxana es más eficaz en lo que se refiere al efecto letal de la droga, que en lo que se refiere al efecto diabetógeno de la misma.

El hecho de que los animales previamente tratados con aloxana no desarrollen uremia cuando son tratados con una dosis de aloxana, que produjo uremia en los animales no tratados previamente, indica que la protección debe estar relacionada con la acción de la substancia sobre el riñón. Las presentes observaciones están de acuerdo en este aspecto con nuestros resultados anteriores, los cuales demuestran que la inyección de aloxana no induce efecto protector en animales con pedículos renales pinzados durante la inyección cuando el pinzamiento se mantiene 10 minutos después de la misma (Oya y Grande, 1947). Si se tiene en cuenta que la aloxana es destruída al cabo de 10 minutos, estos resultados indican que el contacto de la aloxana con el riñón debe ser necesario para el desarrollo del efecto protector.

La protección producida por la dosis de aloxana empleada en los presentes experimentos (35 mg/Kg) no es absoluta, como lo prueba el hecho de que la administración de una dosis elevada de la droga (90 mg/Kg) tuvo un efecto letal en los animales previamente tratados, que no fue distinto del observado en los animales que recibieron la droga por primera vez.

El hecho de que los animales tratados inicialmente con 35 mg/Kg de aloxana mostraran una mayor tolerancia a la administración de la dosis de 50 mg/kg que los animales no tratados previamente, a los tres días de la primera inyección, indica que el mecanismo protector se desarrolla con considerable rapidez.

Referencias

Michon, J. y Arnaud, R., Dosage colorimetrique de l'urée sanguine. *Clin. Chim. Acta.*, **7**: 739 (1962).

Nelson, N., A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**: 375 (1944).

Oya, J. C. de y Grande, F., Observaciones sobre el efecto de una segunda dosis de aloxana en los perros aloxánicos. *Rev. Clin. Esp.*, **17**: 160 (1945).

Oya, J. C. de y Grande, F., Nuevas observaciones sobre la resistencia a la aloxana producida en los animales por la primera inyección de dicha substancia. *Rev. Clin. Esp.*, **24**: 99 (1947).

Pemberton, L. B. y Manax, W. G., Problems in producing alloxan diabetes. *Surgery*, **68**: 375 (1970).

CIENCIA, MÉX.
XXVIII (4) 143-48
31, Diciembre, 1973

EFECTO REFLEJO DE LA INSULINA Y REGULACION DE LA GLUCEMIA

Ramón Alvarez-Buylla

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional
México, D. F.

Resumen

Microdosis de insulina inyectadas en la región irrigada por la arteria pancreático-duodenal, producen hipoglucemia después de un tiempo de latencia menor de 2 minutos. Este efecto no aparece después de la vagotomía abdominal, y aparece en respuesta a la estimulación eléctrica de los cabos centrales de las ramas del vago abdominal seccionadas. La insulina tiene acción refleja, cuya vía aferente está formada por fibras del vago abdominal. El líquido cefalorraquídeo del tercer ventrículo, tomado entre 1 y 10 minutos después de la inyección de insulina, a un gato donador, produce hipoglucemia cuando se inyecta por vía intravenosa a un gato receptor. El efecto hipoglucemiante de este reflejo insulínico es consecuencia de la absorción de glucosa por los tejidos nervioso y muscular. Se confirma la acción refleja de la insulina, al establecer un reflejo condicionado hipoglucemiante en perros y ratas. Este reflejo condicionado no se consigue establecer en animales con vagotomía abdominal o en animales hipofisectomizados.

Summary

Microdoses of insulin injected in the pancreatic-duodenal region, produces a hipoglycemic effect after a latency of less than 2 minutes. This effect was not obtained in vagotomized animals. Stimulation of the central segment of the sectioned vagi produces the hypoglycemic response. The insulin has a reflex action, whose afferent signals are carried by the vagi. The cerebroespinal fluid extracted from the third ventricle of a donor cat from 1 to 10 minutes after an injection of insulin, produces a hipoglycemic response when injected into a recipient cat. The hypoglycemic effect of this insulin reflex is due to glucose absorption by the nervous and muscular tissues. It is confirmed the reflex action of the insulin establishing a hypoglycemic conditioned reflex in dogs and rats. It is not possible to obtain this conditioned reflex in vagotomized or hypophysectomized animals.

Introducción

Desde que en 1857 Claudio Bernard[1] postuló la intervención del sistema nervioso en la regulación de la glucemia, se han realizado numerosos estudios, sin que este importante problema de la fisiología haya quedado resuelto y, como consecuencia, no se puedan comprender muchos aspectos de su patología en la diabetes.

Se ha demostrado la existencia de fibras eferentes vagales que estimulan la secreción de insulina pancreática[2,3,4,5,6]. Hay evidencias recientes[7,8] de la participación del sistema nervioso central en la regulación de la secreción de insulina. En el circuito neuronal regulador de la glucemia, estarían incluídos los núcleos ventromediales del hipotálamo y todo el sistema nervioso simpático.

En este trabajo nos limitaremos a una breve revisión de los resultados que hemos obtenido en el estudio experimental de este tema, incluyendo algunos todavía no publicados. Lo hacemos como homenaje modesto, pero muy sincero, al gran fisiólogo Don Bernardo A. Houssay, cuyas trascendentes y originales aportaciones contribuyen a esclarecer el mecanismo de la homeostasis de la glucosa[9].

Material y Método

Se utilizaron perros, conejos, gatos y ratas de ambos sexos, con edades y pesos variables.

Experimentos con inyecciones de microdosis de insulina en la arteria pancreático-duodenal

En conejos y peros anestesiados con pentobarbital (Nembutal Abbott), se determinaron los cambios en la glucemia después de la inyección de dosis bajas de insulina (0.01 — 0.005 U/Kg). Las muestras de sangre se tomaron de catéteres de polietileno, colocados en la

vena femoral. Las inyecciones de insulina se hicieron por catéteres de polietileno introducidos, en la arteria femoral, hasta las proximidades de la arteria pancreáticoduodenal. En los experimentos con sección de vagos y estimulación, se hizo la vagotomía a nivel abdominal periesofágico, estimulando los cabos centrales durante 30 segundos, a una frecuencia de 20/seg, 2 mseg de duración, e intensidad 3 veces umbral.

Condicionamiento

Los experimentos se realizaron en perros y ratas, en una cámara de condicionamiento. Las inyecciones de insulina y las tomas de sangre se hicieron mediante catéteres de polietileno. En los perros los catéteres se colocaron en la vena safena y en las ratas en la aorta descendente, desde la carótida.

En cada refuerzo de condicionamiento, se empezó por tomar una primera muestra de sangre, inmediatamente después se inyectó la insulina (estímulo incondicionado) y se conectó el timbre (estímulo condicionado) durante 10 minutos. Al final de este período, se apagó el timbre y se tomó la segunda muestra de sangre. Estos refuerzos se repitieron, dos veces al día, durante 4 ó 5 días consecutivos. En la novena o undécima vez se realizó la prueba de condicionamiento procediendo en la misma forma que en los refuerzos, pero inyectando, en lugar de insulina, un volumen igual (0.3 ml) de agua destilada. La dosis de insulina empleada fue de 0.05 u/Kg a los perros, y 0.4 u/100 g a las ratas.

Los controles preliminares realizados en cada animal, pusieron de manifiesto que la inyección de agua destilada asociada con el sonido del timbre no altera la concentración de glucosa en sangre.

Experimentos con mezcla de sangre

En estos experimentos inyectamos sangre de una rata condicionada, durante la prueba de condicionamiento, a una rata normal. A la rata condicionada (donadora) colocada en la cámara de condicionmiento, se le tomó un muestra de sangre basal, inyectando agua destilada y conectando, a continuación, el estímulo condicionado (sonido del timbre); un minuto después se inició la toma de sangre, hasta obtener en 9 minutos, 5 ml. Esta sangre se mezcló con la sangre circulante de la rata receptora no condicionada, inyectando y extrayendo lentamente por un catéter introducido en la carótida 24 horas antes. Se tomaron muestras basales de sangre, y a los 5, 10 y 20 minutos después de comenzar la mezcla. Se realizaron experimentos control utilizando el mismo procedimiento, pero usando como rata donadora una rata normal, no condicionada[12].

Experimentos con líquido cefalorraquídeo

En 10 experimentos en que el líquido cefalorraquídeo de un gato se inyectó a otro (receptor), localizamos el tercer ventrículo estereotáxicamente en el gato donador. Los valores basales de glucosa en sangre se determinaron en muestras de sangre venosa femoral de ambos gatos. Inmediatamente después, se inyectó la insulina (0.05 u/Kg) en el tronco celíaco del donador y se obtuvieron muestras de sangre 2, 5 y 15 minutos después. Entre 1 y 5 minutos de la inyección se extrajo 1 ml de líquido cefalorraquídeo del gato donador, inyectando por la vía intravenosa al receptor y obteniendo muestras de sangre en el gato receptor 2, 5 y 15 minutos después.

Las determinaciones de glucosa en sangre se hicieron por el método de Nelson-Somogyi y el micrométodo de o-Toluidina.

Resultados

Vía aferente del reflejo insulínico.

Si existe alguna intervención nerviosa en la regulación de la glucemia, hay que suponer que

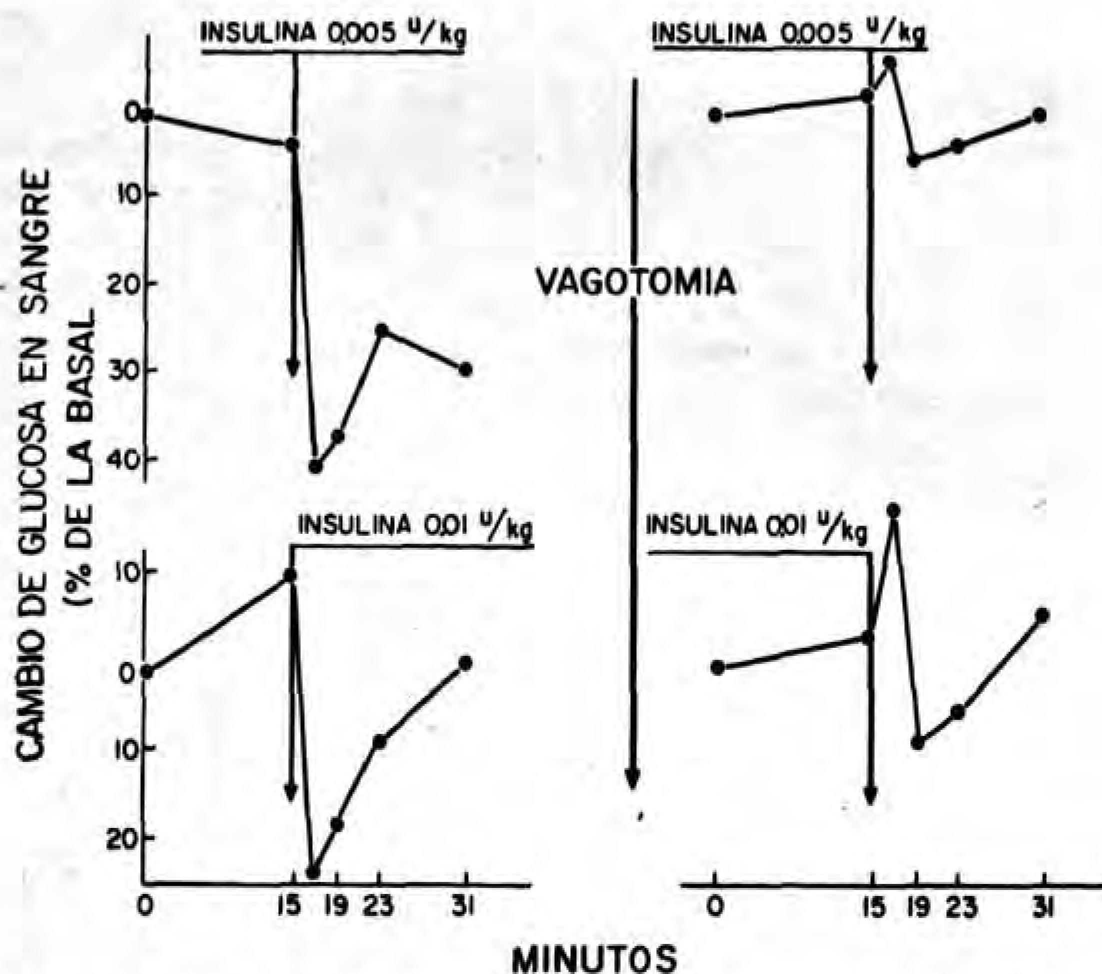


Fig. 1. Microdosis de insulina inyectadas en la arteria pancreáticoduodenal. Cada punto es el promedio de 10 experimentos. Parte superior de la figura: conejo. Parte inferior: perro.

sigue su principio funcional básico, el reflejo. Esto exige una información sensorial específica, que puede ser de origen central, por la presencia de neuronas hipotalámicas glucosensibles, o bien, de origen periférico, por vías aferentes que conduzcan señales con la información de cambios en la glucemia o de factores directamente relacionados con ella.

En la primera serie de experimentos[10], se exploró la existencia de vías aferentes vagales, que inervaran la región pancreático-duodenal. En 10 conejos y 11 perros anestesiados con pentobarbital (45 mg/Kg en los conejos y 30 mg/Kg en los perros), se inyectaron dosis bajas de insulina, a través de un catéter crónico, en la arteria pancreático-duodenal. Los cambios en la glucemia obtenidos en estos experimentos se ilustran en la Fig. 1. Se observó, en todos los casos, una brusca y marcada hipoglucemia, con un tiempo de latencia menor de 2 minutos. La misma dosis de insulina inyectada en la aorta abdominal, por debajo de las a. renales, o en la carótida, no altera la glucemia. Después de la vagotomía, la acción refleja de la insulina desapareció, y las microdosis de insulina, inyectadas en la misma región, no produjeron efectos notables sobre la glucemia (Fig. 1).

La estimulación eléctrica del cabo central del vago abdominal seccionado produjo marcada hipoglucemia, con un tiempo de latencia menor de 2 minutos (Fig. 2).

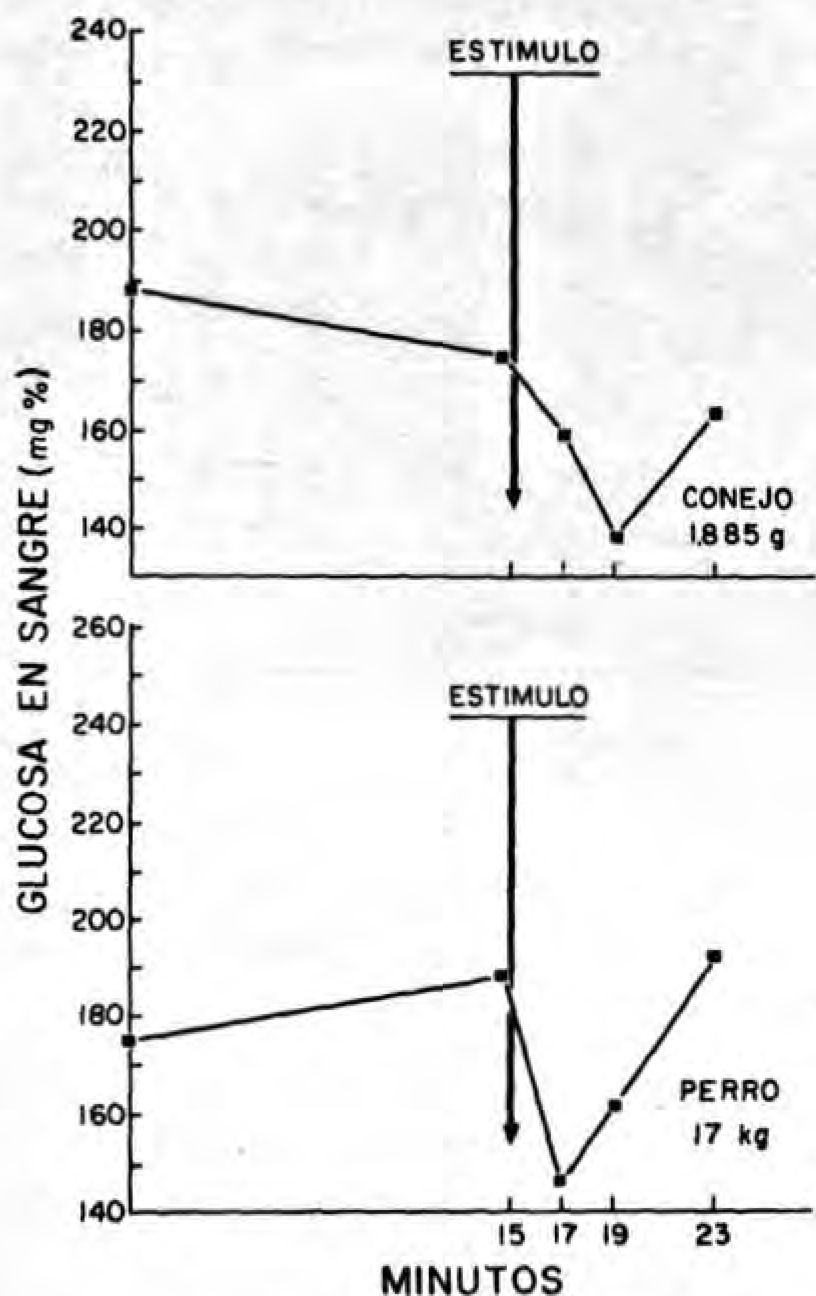


Fig. 2. Estimulación de los cabos centrales del vago abdominal y cambios en la glucosa sanguínea.

Reflejo condicionado hipoglucemiante.

La existencia de esta acción refleja de la insulina, y la intervención del sistema nervioso en la regulación de la glucemia, se pudieron comprobar estableciendo un reflejo condicionado. Se asoció temporalmente el estado hipoglucémico producido por la inyección de insulina, con el sonido amortiguado de un timbre (estímulo indiferente) durante 11 veces consecutivas. Cuando el estímulo indiferente se aplicó solo, al duodécimo día, se obtuvo la respuesta hipoglucémica, semejante estadísticamente al promedio de las hipoglucemias obtenidas con las inyecciones de insulina[11]. En la Fig. 3 se

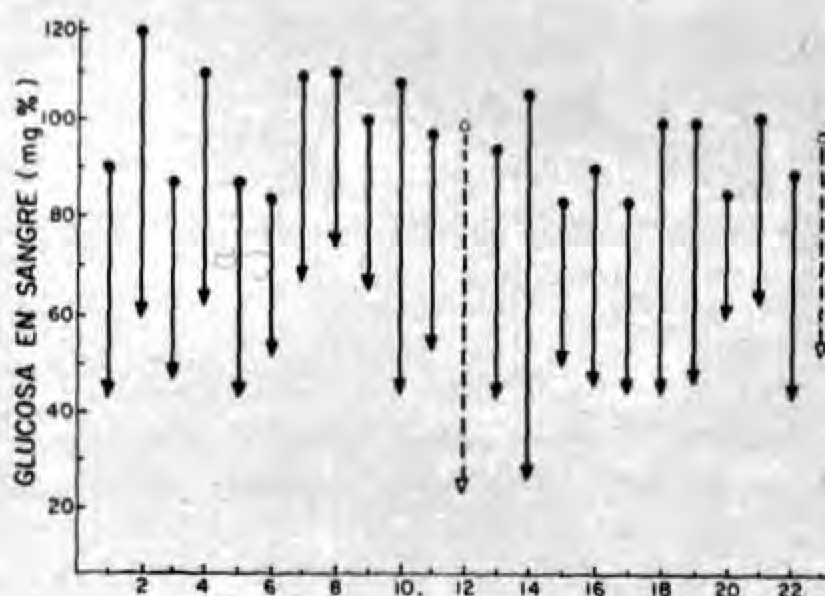


Fig. 3. Reflejo condicionado en perro normal. Abscisas: número de experimentos. Círculos: concentración de glucosa basal. Triángulos negros: concentración de glucosa 10 minutos después de la inyección de insulina acompañada del timbre. Triángulos blancos: concentración de glucosa 10 minutos después de conectar el timbre sin insulina.

ilustran los resultados obtenidos en uno de los 9 perros estudiados. La hipoglucemia condicionada así obtenida, desaparece después de la vagotomía abdominal, aun cuando se aumente 4 veces la dosis de insulina empleada en los refuerzos[10].

En 7 ratas se estableció el reflejo condicionado hipoglucemiante, obteniendo los resultados que se ilustran en la Fig. 4. El efecto hipoglucémico condicionado fue de magnitud semejante al promedio de las hipoglucemias obtenidas después de las inyecciones de insulina acompañadas del sonido del timbre[12].

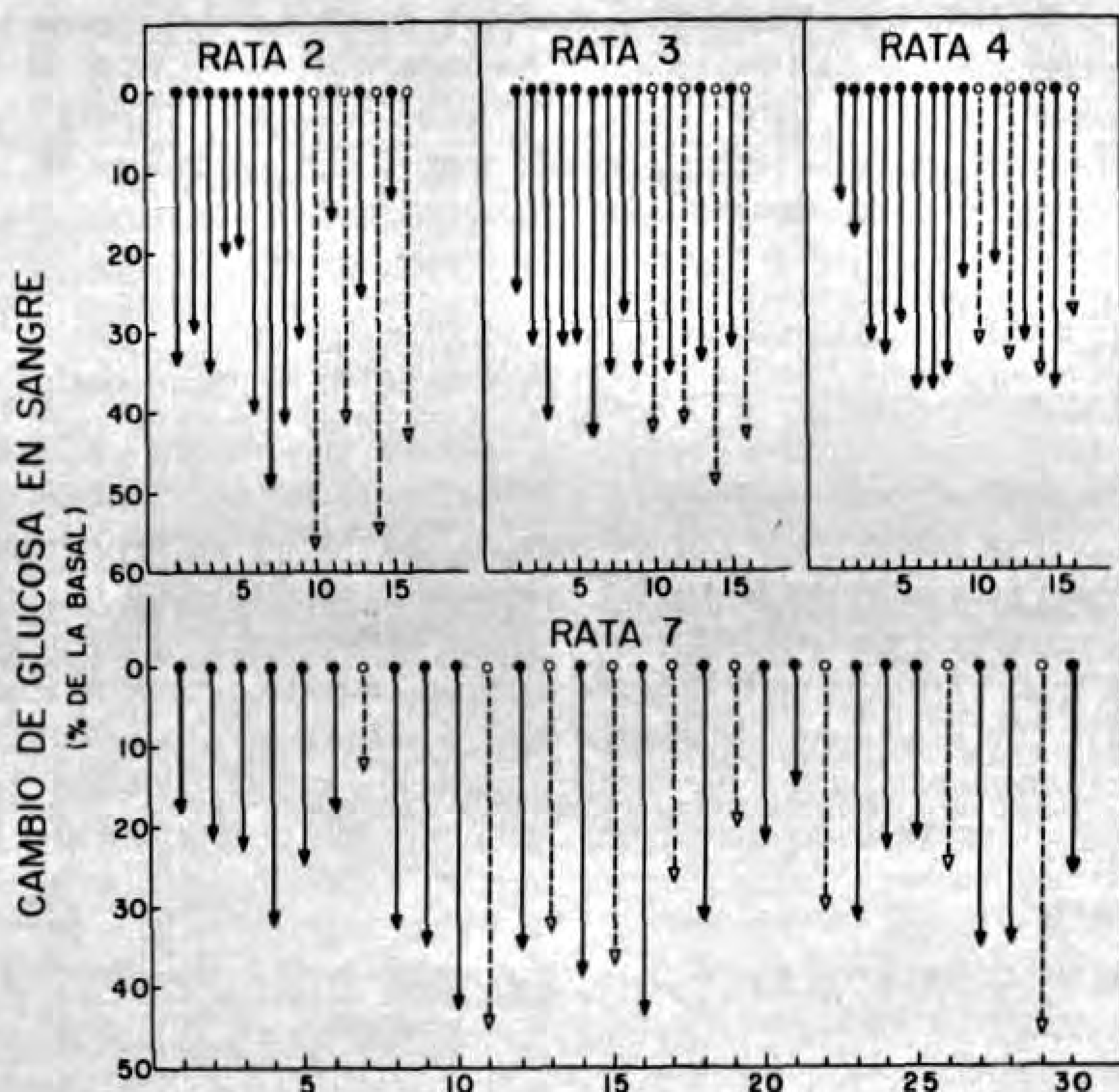


Fig. 4. Reflejo condicionado hipoglucemiante en ratas normales. Abscisas y símbolos: como en la Fig. 3.

Estos resultados muestran que la insulina inicia un reflejo hipoglucemiante que puede ser condicionado.

Mecanismo efector del reflejo hipoglucemiante.

Por las características temporales de la hipoglucemia refleja (latencia y duración), no parecía aceptable proponer que el reflejo iniciado por la insulina tuviera como respuesta efectora la secreción de nueva insulina. Esta volvería a iniciar el reflejo, cerrando así un círculo que mantendría más tiempo la secreción de insulina, prolongando sus efectos hipoglucemiantes, directo o periférico.

En perros aloxanizados, con insuficiencia insulínica profunda, y en perros pancreatectomizados[11], se estableció el reflejo hipoglucemiante en la misma forma que en los perros normales (Fig. 5). Estos hechos nos hacen pensar que existe otro factor hipoglucemiante, no secretado por el páncreas, con un tiempo de latencia más corto que el de la insulina.

Se hicieron 4 experimentos en ratas, con objeto de saber si el factor que producía la hipoglucemia, en los experimentos de prueba de condicionamiento, se encontraba en la sangre circulante. Se tomaron 5 ml de sangre de una rata condicionada (donadora) y, por inyección y absorción, se mezclaron durante 10 minutos

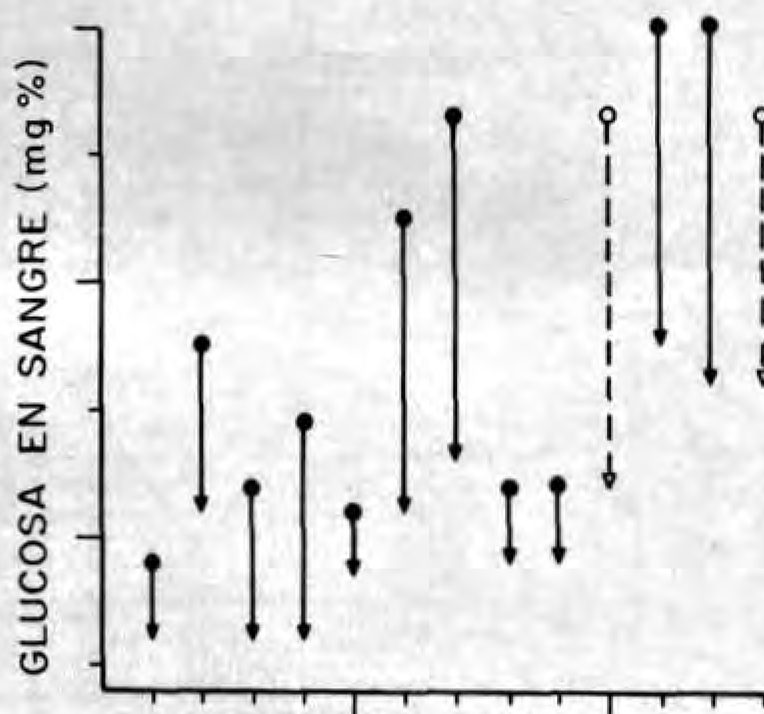


Fig. 5. Reflejo condicionado hipoglucemiante en perro pancreatectomizado. Abscisas y símbolos: como en la Fig. 3.

con la sangre circulante de una rata normal (receptora). En la Fig. 6 se ilustran los resultados obtenidos en una de estas ratas. En A, se ve que[12] la mezcla de sangres, provenientes de una rata normal, no condicionada, con la sangre circulante de otra rata receptora, no produjo efecto hipoglucémico. En B, de la misma figura, tenemos la hipoglucemia obtenida (más del 40%) en la rata receptora, cuando recibió la sangre de una rata donadora, durante el efecto hipoglucémico del reflejo condicionado.

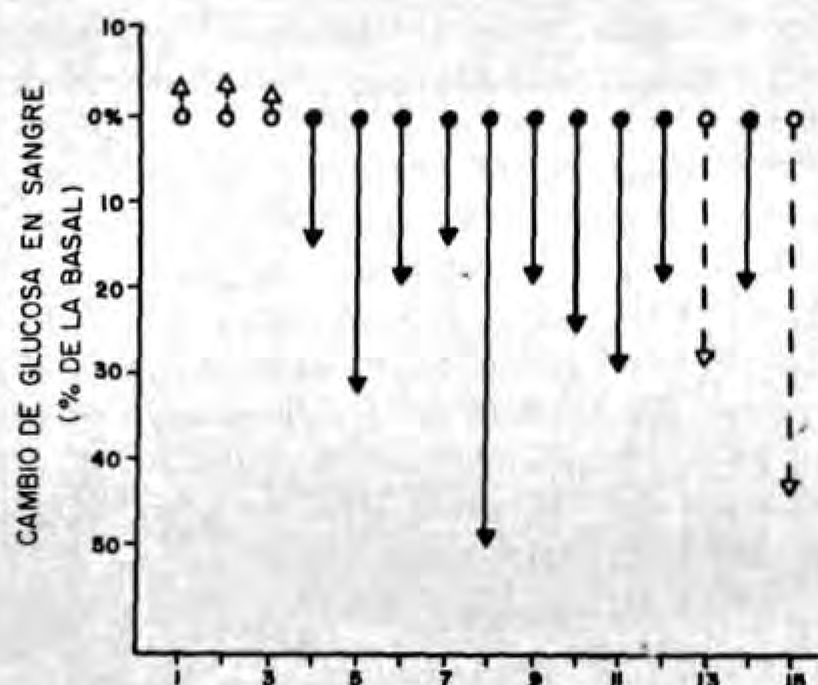


Fig. 6. Reflejo condicionado hipoglucemiante en un perro con trasplante de glándula salival después de la hipofisectomía total. Abscisas y símbolos: como en la Fig. 3.

Los brillantes trabajos de Houssay y col.[13-16] indican la posible intervención de la hipófisis en la secreción de este factor hipoglucemiante. En perros hipofisectomizados, la asociación temporal del sonido del timbre con la inyección de 0.05 u/Kg de insulina no produjo el reflejo condicionado hipoglucemiante, a pesar de que el número de refuerzos dado fue muy numeroso[17]. Estos experimentos favorecen la hipótesis de la existencia de un factor hipoglucemiante de origen hipofisario. Se planteó el problema de si el nuevo factor hipoglucemiante se producía en la hipófisis o era secretado por el sistema nervioso. En experimentos realizados en perros[18] se substituyó la hipófisis extirpada por un fragmento de glándula parótida. Quince días después de la operación se consiguió establecer el reflejo condicionado hipoglucemiante, utilizando dosis bajas de insulina (0.05 u/Kg), semejantes a las utilizadas en los perros normales (Fig. 7).

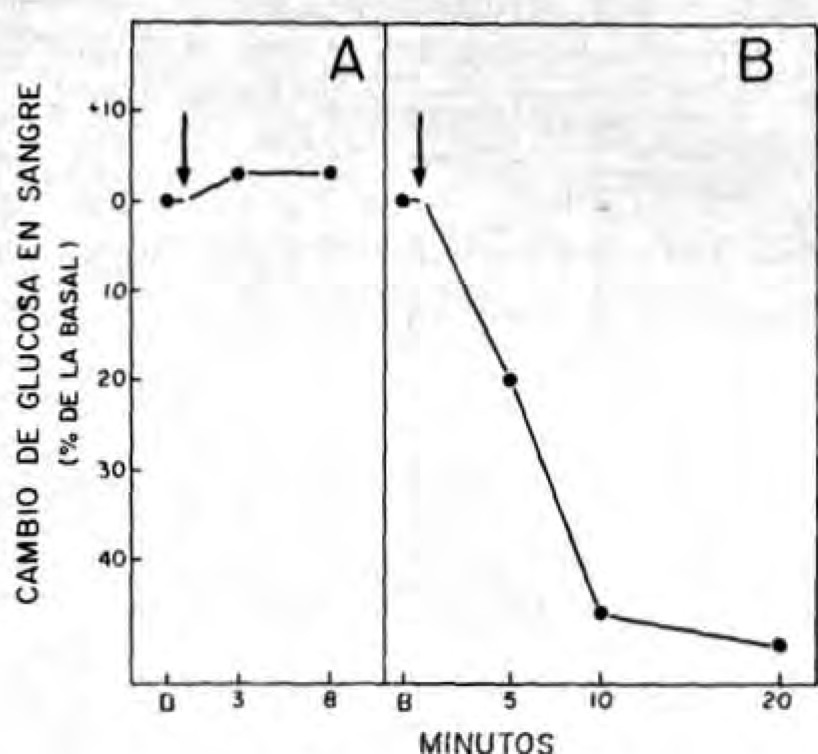


Fig. 7. Efecto de la inyección de sangre circulante de una rata condicionada (donadora), sobre la glucemia de de una rata normal (receptora). *A*: control, la rata receptora recibe la sangre de una rata normal, no condicionada. *B*: la rata receptora recibe la sangre de una rata condicionada, obtenida el día del experimento de prueba. Las flechas indican el momento de la inyección (5 ml).

En una nueva serie experimental realizada en gatos, se puso de manifiesto que un factor hipoglucemiante estaba presente en el líquido cefalorraquídeo del tercer ventrículo después de la inyección de insulina. A un gato donador, 2 minutos después de inyectarle 0.05 u/Kg de insulina en el tronco celíaco, se le extrajo 1 ml de líquido cefalorraquídeo. Este líquido produjo una hipoglucemia notable, con un tiempo de latencia corto, cuando se inyectó por vía intravenosa a un segundo gato (receptor). No se observó hipoglucemia en el gato donador. Los efectos fueron semejantes en los 10 experimentos realizados. La Fig. 8 ilustra los resultados obtenidos en uno de estos experimentos.

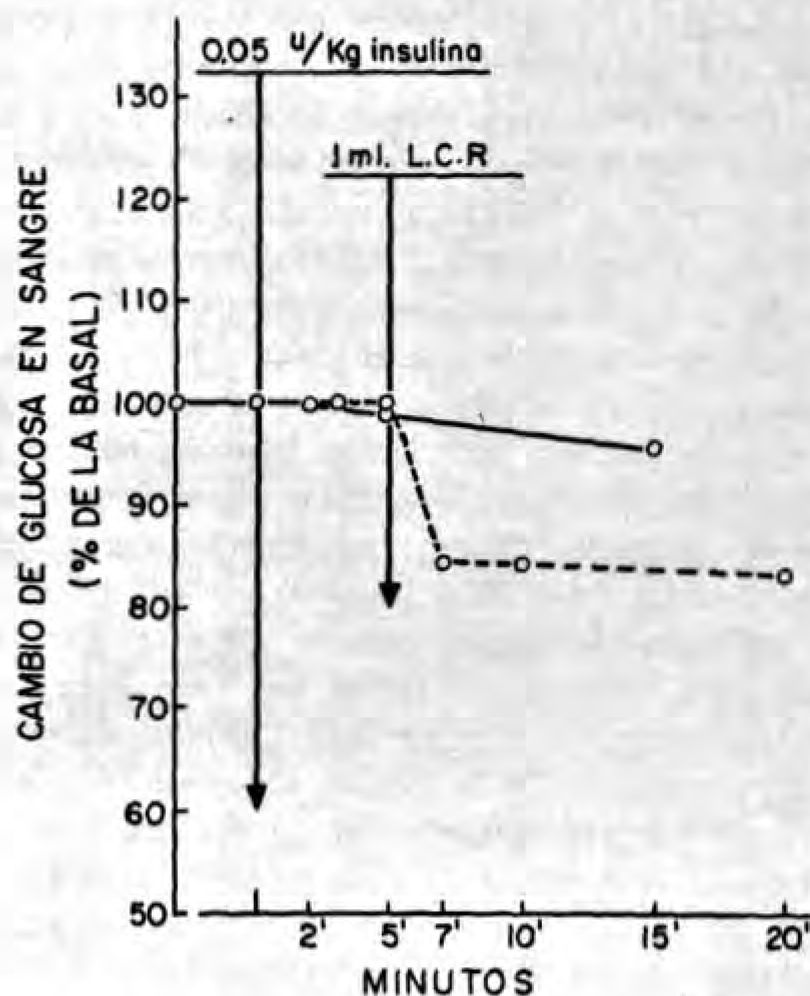


Fig. 8. Inyección de 0.05 u/Kg de insulina en la aorta torácica de un gato donador, y 1 ml de líquido cefalorraquídeo del gato donador (1 a 5 minutos después de la insulina) a un gato receptor. Las flechas indican el momento de la inyección. Las líneas continuas: gato donador. Líneas punteadas: receptor.

Estos útimos resultados sugieren que el mecanismo efector del reflejo hipoglucemiante es una neurosecreción con importante participación funcional de la hipófisis.

Discusión

Después del descubrimiento de la insulina, la investigación de la posible intervención del sistema nervioso en la regulación de la glucemia, se concentró en el estudio de la inervación del páncreas. Clark[19], en el año 1926 postuló la existencia de fibras efectoras vagales; Puche[20], en 1927, en ingeniosos experimentos con anastomosis de vena pancreática de un perro a la yugular de otro, obtuvo hipoglucemia en el segundo, en respuesta a la estimulación eléctrica del cabo periférico del vago del primer perro. Esta fue una demostración experimental clara y directa de la inervación vagal efectora de las células beta de los islotes pancreáticos. Zunz y La Barre[21], Etcheverry[22] y otros[4,5], confirmaron los resultados anteriores, y en la actualidad se admite, sin discusión, la existencia de esta inervación vagal efectora del páncreas endócrino.

Estos últimos resultados sugieren que el mecanismo efector del reflejo hipoglucemiante sea una neurosecreción con importante relación funcional de la hipófisis.

Los resultados expuestos en la primera parte de este trabajo demuestran que la inervación vagal del páncreas no es sólo eferente, ya que hay fibras aferentes vagales, específicamente sensibles a la insulina. Los receptores insulinosensibles informan, indirectamente, a los centros de cambios en la glucemia; esta información, conducida por fibras del vago abdominal, llega al núcleo solitario, y de ahí al sistema hipotálamo-hipofisario, motivando como respuesta efectora la neurosecreción del factor hipoglucemiante. Los experimentos realizados en gatos demostraron la presencia de una neurosecreción en el líquido cefalorraquídeo pocos segundos después de iniciarse el reflejo, por insulina, o por la excitación eléctrica de ramas del vago abdominal. Su acción es facilitar la absorción de glucosa a neuronas y músculos durante los primeros minutos[10]. Terminado este rápido efecto reflejo de la insulina, ésta continuaría su acción lenta en la periferia, depositando la glucosa restante, principalmente en el hígado.

Houssay y col.[23] demostraron la actividad diabetogénica de los extractos pituitarios provocando la diabetes hipofisaria y fueron los primeros en observar[24] la hipersensibilidad a la insulina de los animales hipofisectomizados. El hecho de que la extirpación del lóbulo anterior de la hipófisis atenúe la diabetes pancreática[25], conocido como "perro de Houssay", demuestra la influencia hipofisaria en la homeostasis de la glucosa.

El conocimiento de este reflejo insulínico abre un nuevo sendero para el estudio del mecanismo regulador de la cantidad de glucosa en el lado encefálico de la barrera hematoencefálica, donde la insulina no es el elemento regulador. También podría facilitar la comprensión de hechos hasta ahora inexplicables, como son el experimento del "perro de Houssay", y algunos aspectos de la diabetes.

Bibliografía

1. Bernard, C., Leçons sur système nerveux, París, 1857.
2. Puche, J., El sistema nervioso autónomo en la regulación de la glucemia. Tesis. Barcelona, 1927.
3. Frohman, L. A., *Ann. Rev. Physiol.*, **31**: 353, 1969.
4. Daniel, P. M. y J. R. Henderson, *J. Physiol.*, **192**: 317, 1967.
5. Nelson, N. C., W. G. Blackard, J. C. Cocchiara y J. A. Labat, *Diabetes*, **16**: 852, 1967.
6. Porte, D. Jr., *Diabetes*, **20**: 340, 1971.
7. Müller, E. E., L. A. Frohman y D. Cocchi, *Amer, J. Physiol.*, **224**: 1210, 1973
8. Frohman, L. A. y L. L. Bernardis, *Amer. J. Physiol.*, **221**: 1596, 1971.
9. Houssay, B. A., *J. Endocrinology*, **21**: Proc. 1, 1960-1961.
10. Alvarez-Buylla, R., E. T. Segura y E. R. de Alvarez-Buylla, *Acta physiol. latinoam.*, **11**: 43, 1961.
11. Alvarez-Bullya, R. y J. Carrasco-Zanini, *Acta physiol. latinoam.*, **10**: 153, 1960.
12. Alvarez-Buylla, R. y E. R. de Alvarez-Buylla, *J. Comp. Physiol. Psychol.* (En prensa).
13. Houssay, B. A., *New England J. Med.*, **24**: 961, 1936.
14. Houssay, B. A., *Endocrinology*, **30**: 884, 1942.
15. Houssay, B. A., IV int. Congr. Hematol., Mar del Plata, **23**: 1952.
16. Houssay, B. A., *Proc. Soc. Biol. Chem. India*, **14**: 1, 1956
17. Alvarez-Buylla, R., E. T. Segura y E. R. de Alvarez-Buylla, *Acta physiol. latinoam.*, **11**: 113, 1961.
18. Alvarez-Buylla, R. y E. R. de Alvarez-Buylla, *Acta physiol. latinoam.*, **13**: 306, 1963
19. Clark, G. A., *J. Physiol.*, **61**: 576, 1926.
20. Puche, J., *Rev. Med. de Barcelona*, **8**: 255, 1927.
21. Zunz, E. y J. la Barre, *Ann. Physiol. et Phys. Chim. Biol.*, **4**: 688, 1928.
22. Etcheverry, A. O., Regulación nerviosa de la secreción interna del páncreas. Tesis. Buenos Aires, 1937.
23. Houssay, B. A., Biasotti, A. Di Benedetto y C. T. Rietti, *C. R. Soc. Biol. Paris*, **112**: 494, 1933.
24. Houssay, B. A. y A. Magenta, *C. R. Soc. Biol., Paris*, **92**: 822, 1925
25. Houssay, B. A. y A. Biasotti, *C. R. Soc. Biol., Paris*, **104**: 407, 1930.

CIENCIA, MÉX.
XXVIII (4) 149-54
31, Diciembre, 1973

CONSIDERACIONES SOBRE UN CIRCUITO REGULADOR DE LA INGESTION DE SODIO

MIGUEL R. COVIAN

Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia,
14.100 Ribeirão Preto, S.P., Brasil.

RESUMEN

Un circuito nervioso central regulador de la ingestión de NaCl está integrado por el hipotálamo, amígdala y área septal. El papel desempeñado por este circuito ha sido demostrado por lesiones electrolíticas. Lesiones en el hipotálamo anteromedial determinan una disminución de la ingestión, mientras que lesiones en el hipotálamo anterolateral causan un efecto inverso. Lesiones del área septal aumentan el consumo de la solución salina. En el complejo amigdalino, lesiones de la región corticomedial aumentan la ingestión y lesiones de la región lateral la disminuyen.

Los estudios de interacción entre las diversas estructuras del circuito demuestran que el hipotálamo desempeña el papel principal y que el área septal y amígdala tienen una acción moduladora sobre su actividad.

SUMMARY

A regulating circuit for NaCl intake is integrated by septal area, amygdaloid complex and hypothalamus. The role played by the circuit has been proved by electrolitic lesions. Lesions in the anteromedial hypothalamus cause a decrease in the intake of saline solution while lesions in the anterior lateral hipothalamus cause an increase in saline intake. Lesions of septal area also increase the ingestion of saline. The lesion of the corticomedial region of amygdala increases sodium intake and lesions of lateral region decrease it.

Interactions studies provide evidence that the hypothalamus is the main structure of the circuit regulating saline ingestion and that the septum and amygdala have modulating in:luences on its activity in this regard. In turn, septal area overcomes the action of the amygdala.

El agua es el componente más abundante del organismo humano, pues constituye del 45-75% del peso corporal. De este hecho se desprende la importancia de su regulación. La ingestión de líquidos forma parte de un mecanismo homeostático que regula la concentración y, posiblemente, el volumen de los líquidos del organismo. Por consiguiente, debe haber una estrecha correspondencia entre las necesidades orgánicas de líquidos y su ingestión. Se acepta que el factor determinante de la ingestión de líquidos es la osmolaridad efectiva de los flúidos orgánicos y se sabe que en esta osmolaridad son los electrolitos los que desempeñan el papel decisivo. De allí la importancia del estudio de la ingestión de agua y de sodio.

Dos son los mecanismos que regulan la ingestión de sodio: endócrino y neural, que en la mayoría de las situaciones trabajan integradamente.

REGULACIÓN ENDÓCRINA

Los trabajos de Richter (1936) y Covian (1946) demuestran el valor homeostático del comportamiento apetitivo, pues las ratas adrenalectomizadas aumentan la ingestión de NaCl proporcionalmente a las pérdidas. Cuanto más concentrada es la solución, menor es el volumen ingerido, pero la cantidad total de sodio es aproximadamente la misma. Epstein y Stellar (1955) observaron que cuando las ratas eran privadas de sal durante 10 días después de la adrenalectomía, para que se estableciese un déficit severo, la ingestión inmediata reflejaba la extensión de la carencia. La naturaleza ofrece claros ejemplos de este papel homeostático del comportamiento, como el estudiado por Myers (1897) en los conejos salvajes de las montañas del sudeste de Australia. Estos animales, cuando la nieve se derrite al fin del invierno y comienzo de la primavera, demuestran una avidez espe-

cial por las estacas impregnadas con bicarbonato o cloruro de sodio, a las cuales lamen o muerden, e ignoran aquellas impregnadas con magnesio, potasio o calcio. Este comportamiento desaparece cuando crecen los pastos, pues en ellos encuentran la fuente natural de sodio.

Regulación nerviosa central

Hipotálamo

La pregunta que surge es esta: ¿existe una regulación realizada por el SNC de la ingestión de sodio y, si existe, se realiza a través de una organización central integrativa, que motiva y dirige el comportamiento, una situación semejante a la regulación de la ingestión de alimentos? Nuestros trabajos en este campo se iniciaron en 1960, cuando observamos con Antunes Rodrigues que las ratas hembras disminuían la ingestión de NaCl 2% después de la hemidecorticación, mientras que los machos la aumentaban, lo que atribuímos a un diferente estado funcional de las adrenales: hiperfunción en las primeras e hipofunción en los segundos. A este estudio le siguió un mapeo, milímetro a milímetro, del hipotálamo, con el sorprendente hallazgo de dos zonas (Figs. 1 y 2) una anteromedial, que cuando es destruída bilateralmente, determina un aumento específico de la ingestión de NaCl 2%, y otra anterolateral, cuya destrucción provoca un aumento de la ingestión de sodio (Covian y Antunes Rodrigues, 1963).

Con la idea de que comportamientos complejos requieren la interacción de diferentes partes del sistema nervioso central, no dependiendo

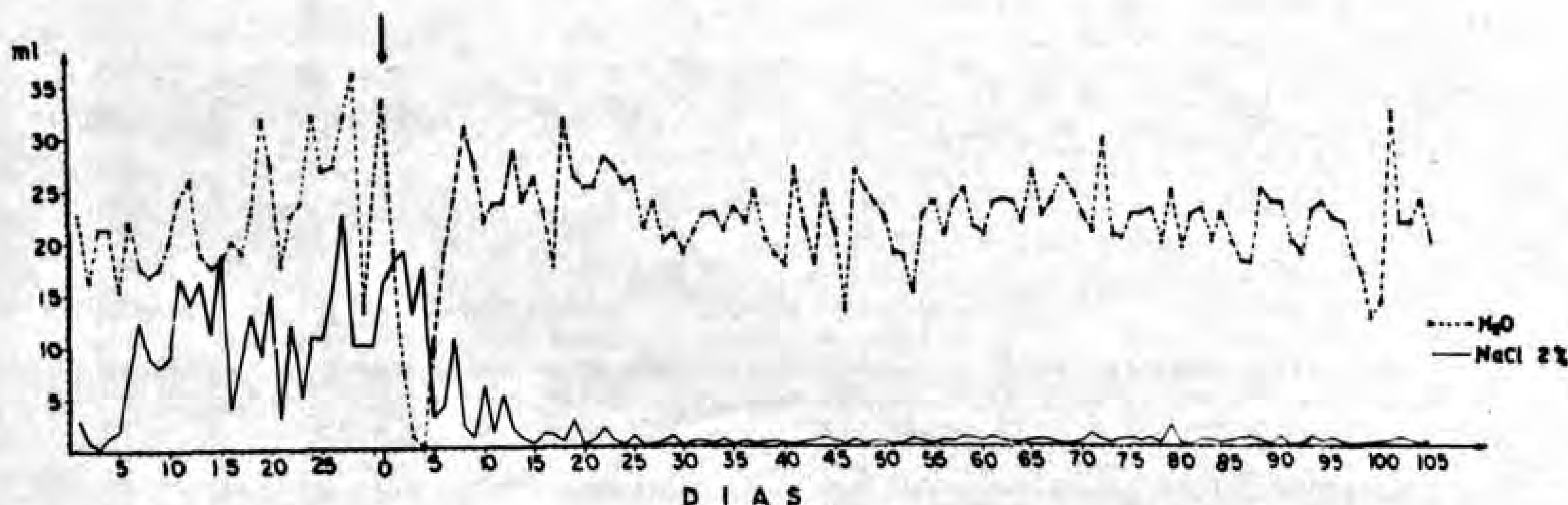


Fig. 1. Ingestión diaria de una solución de NaCl 2% (línea llena) y de agua (línea interrumpida) en una rata en la cual hubo una disminución específica de la ingestión de NaCl por lesión hipotalámica. La flecha indica el día de la lesión hipotalámica anteromedial. Ordenada: cantidad de líquidos ingerida, en ml. Abscisa: tiempo en días. Parámetros: F,7.0; L,2.0; H,–3.0.

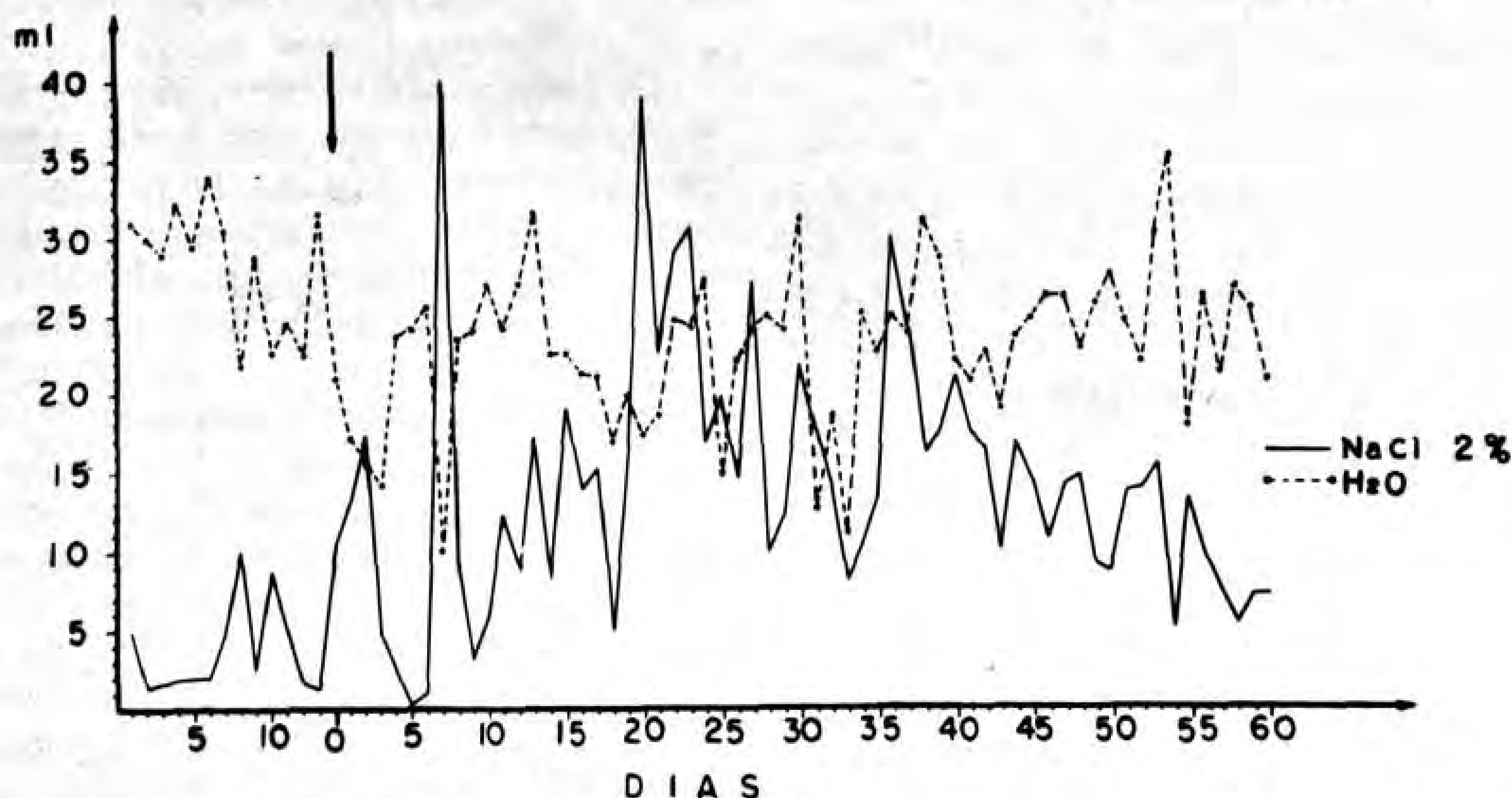


Fig. 2. Ingestión diaria de una solución de NaCl 2% (línea llena) y de agua (línea interrumpida) en una rata en la cual hubo un aumento específico de la ingestión de NaCl. La flecha indica el día de la lesión hipotalámica anterolateral. Ordenada: cantidad de líquidos ingerida, en ml. Abscisa: tiempo en días. Parámetros: F,6.5; L,0.5; H,–3.0.

por lo tanto solamente de una región circunscrita, y teniendo en cuenta las estrechas conexiones del hipotálamo con dos estructuras límbicas, el área septal y la amígdala, investigamos el papel que estas últimas desempeñan en la ingestión de sodio.

Area septal

La destrucción electrolítica bilateral del septum da como resultado un aumento del consumo de NaCl 1.5% y una disminución del de agua, estando aumentada la ingestión de agua total. Este efecto dura 2-3 meses. Cuando la lesión es unilateral, la modificación es más pasajera, desapareciendo alrededor de los 45 días (Negro Vilar y col., 1965, 1967). Lesiones circunscritas a los núcleos medial o lateral determinan un aumento específico de la ingestión de NaCl, pues la de agua no se modifica significativamente (Grace, 1968; Chiaraviglio, 1969; Gentil, 1972).

Amígdala

En esta estructura fueron localizadas, como en el hipotálamo, dos áreas de efectos opuestos (Gentil y col., 1968). Lesiones realizadas en la amígdala posterior, con destrucción del complejo corticomedial (especialmente del núcleo cortical) provocaron un aumento de la ingestión de NaCl 1.5% y disminución en la de agua, aunque el agua total aumentó (Fig. 3). Por el contrario,

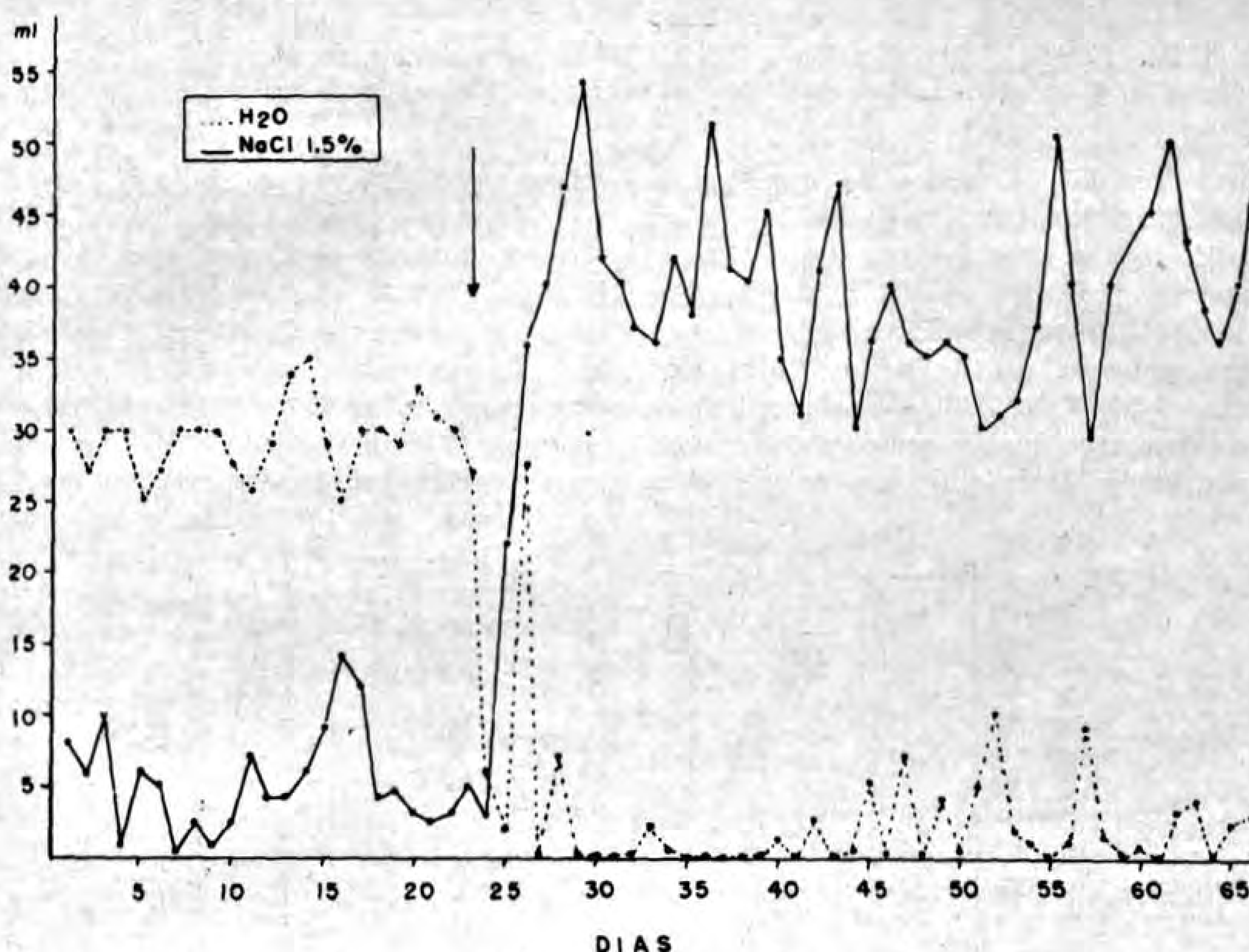


Fig. 3. Evolución diaria de la ingestión de cloruro de sodio 1.5% y de agua en una rata que presentó aumento de la ingestión de sal por lesión de la amígdala. Mismas indicaciones que en la Fig. 1. Parámetros: F,4.4; L,4.5; H,–3.5.

si en la amígdala central se lesionaba el núcleo lateral, comprometiendo también los núcleos medial, basolateral y basomedial, se obtuvo una disminución de la ingestión salina, sin modificación de la ingestión de agua (Fig. 4).

Es bueno destacar que, en todos los estudios mencionados, las modificaciones de la ingestión de sodio siempre precedieron a sus modificaciones urinarias.

Interacción entre el hipotálamo, amígdala y área septal en la regulación de la ingestión de sodio

Los resultados presentados apoyan la hipótesis de la existencia de un circuito relacionado con la ingestión de sodio, integrado por el área septal, amígdala e hipotálamo. Cuando una función o comportamiento depende de la interacción de diversas estructuras, como en el caso

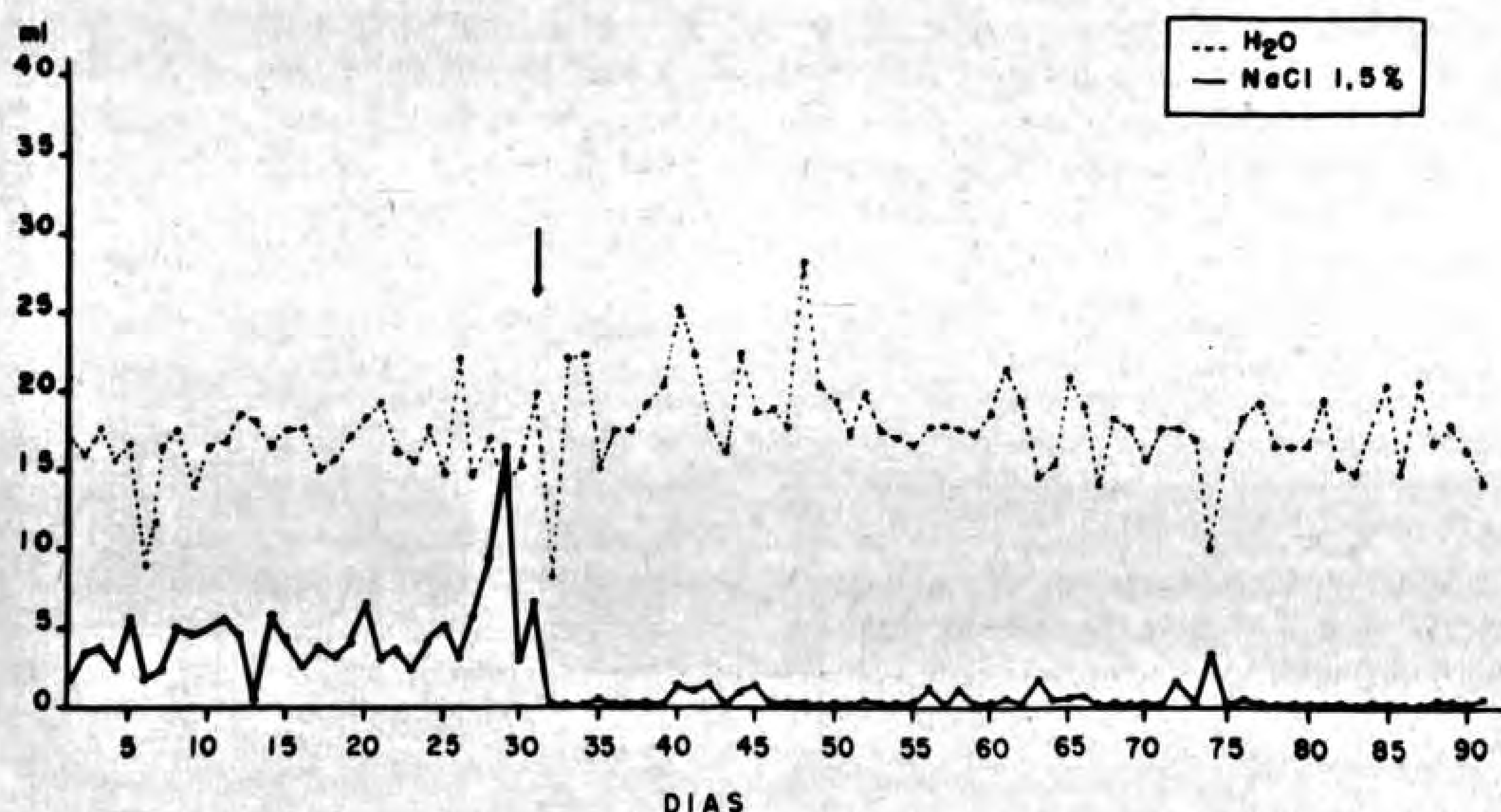


Fig. 4. Evolución diaria de la ingestión de cloruro de sodio 1.5% y de agua en una rata que disminuyó la ingestión de la solución salina por lesión de la amígdala. Mismas indicaciones que en la Fig. 1. Parámetros: F,5.2; L,4.0; H,–2.5.

presente, uno de los modos de investigar si existe una cierta jerarquía entre ellas, consiste en realizar lesiones en el mismo animal que, hechas aisladamente, provocan resultados inversos. Así podrá ser posible averiguar si existe una estructura que comanda y otras subordinadas. Con este criterio (Saad y col., 1971, 1972), en un lote de ratas cuya ingestión de sodio estaba aumentada por lesión de la amígdala, se realizó la lesión hipotalámica, que en ratas intactas provoca disminución de la ingestión, y se observó el predominio hipotálamico, pues las ratas bajaron su nivel de ingestión (Fig. 5). Cuando las operaciones fueron realizadas en sentido inverso, la lesión amigdalina no modificó la disminuida ingestión de sodio determinada por lesión hipotalámica (Fig. 6). La interacción septal-hipotálamo también evidenció el predominio hipota-

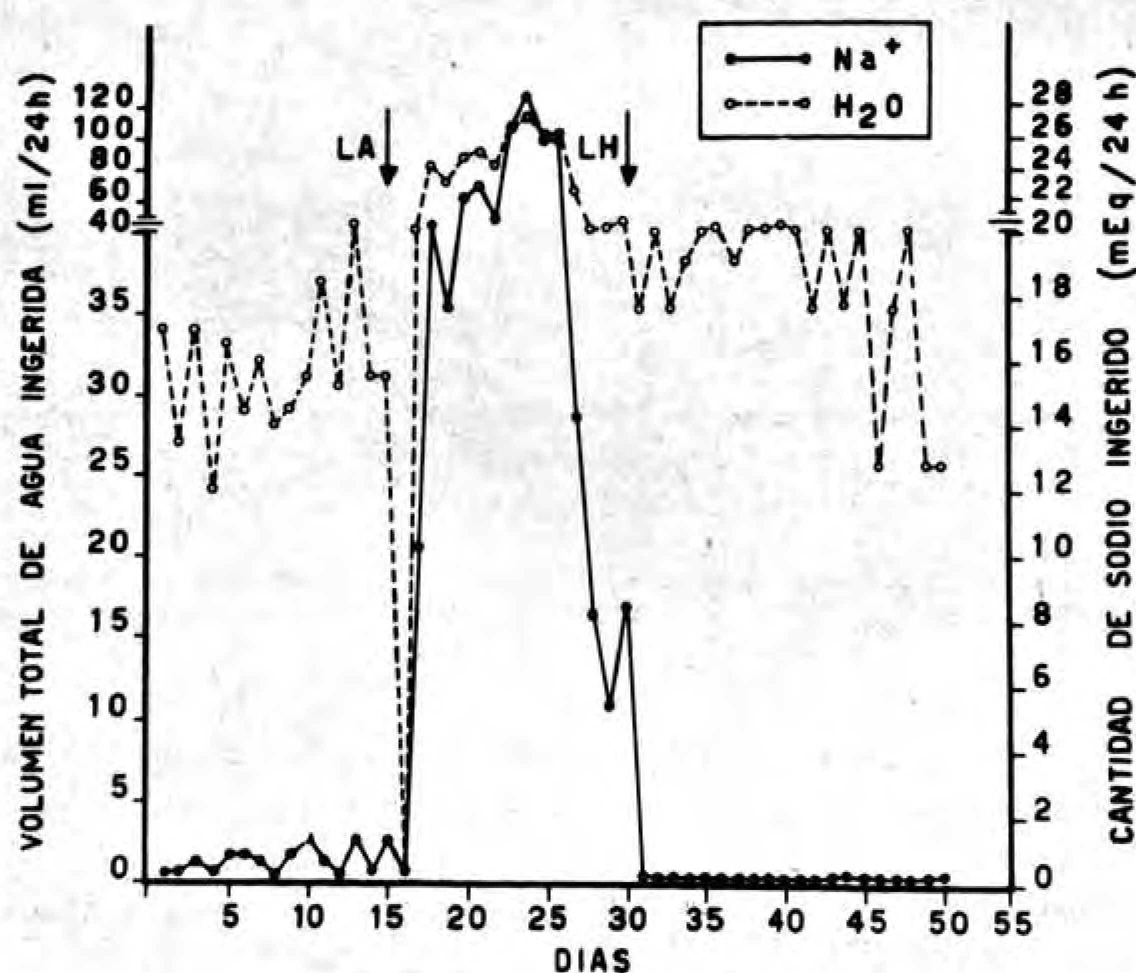


Fig. 5. Evolución diaria de la ingestión de cloruro de sodio 1.5% (línea llena) expresada en mEq/24 h y total de agua (línea interrumpida) expresada en ml/24 h de una rata en que se efectuó primeramente la lesión amigdalina (LA) seguida de lesión hipotalámica (LH). Las flechas indican el día de las operaciones.

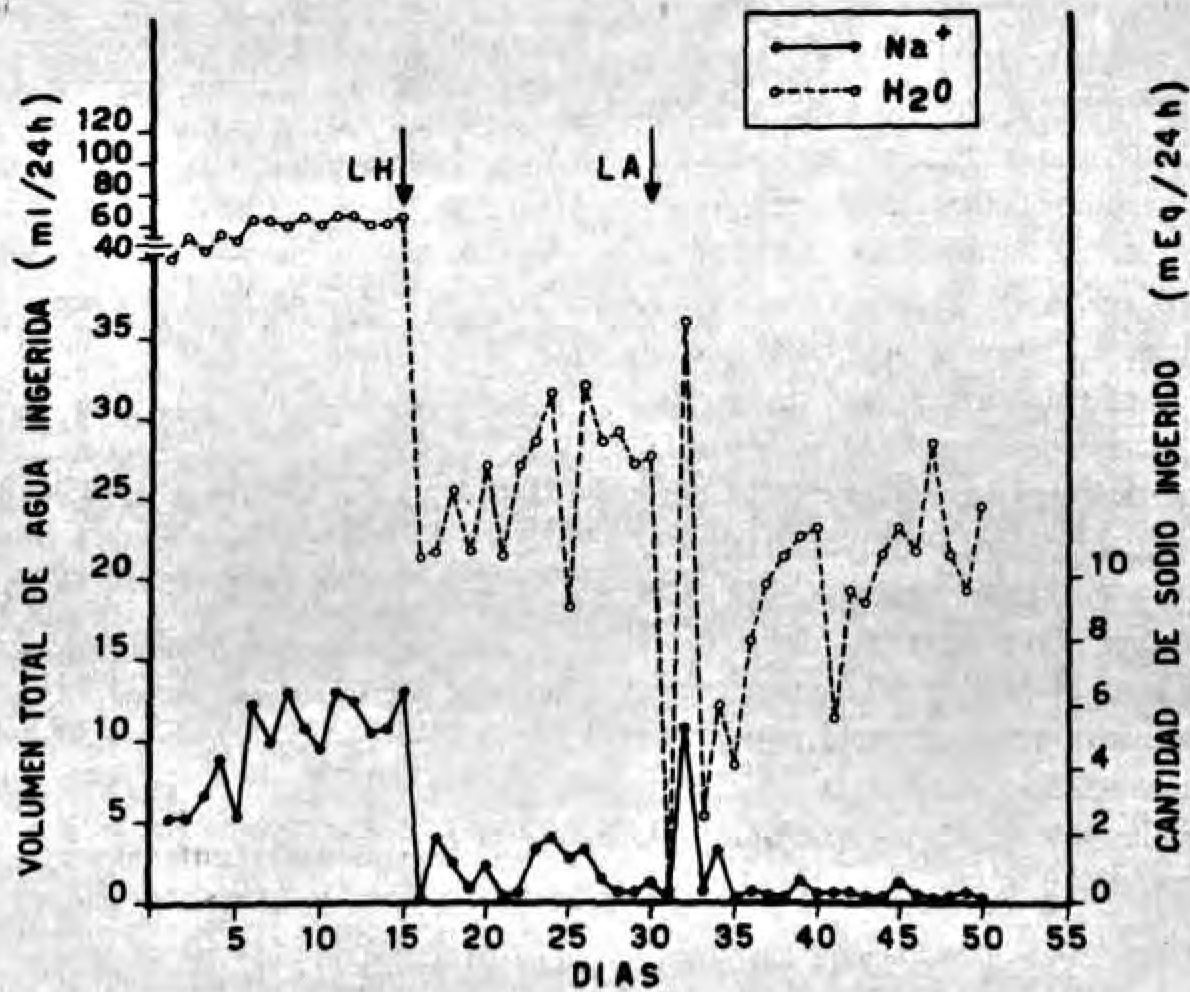


Fig. 6. Evolución diaria de la ingestión de cloruro de sodio 1.5% expresada en mEq/24 h (línea llena) y de agua total expresada en ml/24 h (línea interrumpida) en una rata en la que se efectuó primeramente la lesión hipotalámica seguida de lesión amigdalina. Las flechas indican el día de las operaciones.

lámico. En los experimentos para estudiar la interrelación septo-amígdala, se observó que el área septal era la estructura preponderante.

Estos estudios revelan que los efectos de las lesiones hipotalámicas superan aquellos de la amígdala y área septal y que, a su vez, los de área septal se sobreponen a los de la amígdala. La base anatómica de estas interacciones está dada por los estudios de diferentes autores que demuestran las íntimas conexiones existentes entre el hipotálamo, amígdala y área septal (Nauta, 1960; Pribram, 1961; Raisman, 1966a, b, 1970; Morgane, 1969). Experimentos utilizando la técnica del potencial evocado, también demuestran la relación entre estas estructuras (Aguilar-Baturoni y col., 1974).

De acuerdo con estos resultados, el hipotálamo es la estructura del SNC de mayor importancia en la regulación de la ingestión de sodio, apareciendo la amígdala y área septal como estructuras moduladoras de su actividad en esta regulación.

La Fig. 7 es un diagrama que resume nuestros estudios: el hipotálamo es considerado el principal regulador de la ingestión de sodio, con dos regiones de efectos opuestos, indicadas por + y –. Cuando es lesionada la región que normalmente induce al animal a ingerir sodio (+) la balanza se desequilibra, la influencia negativa

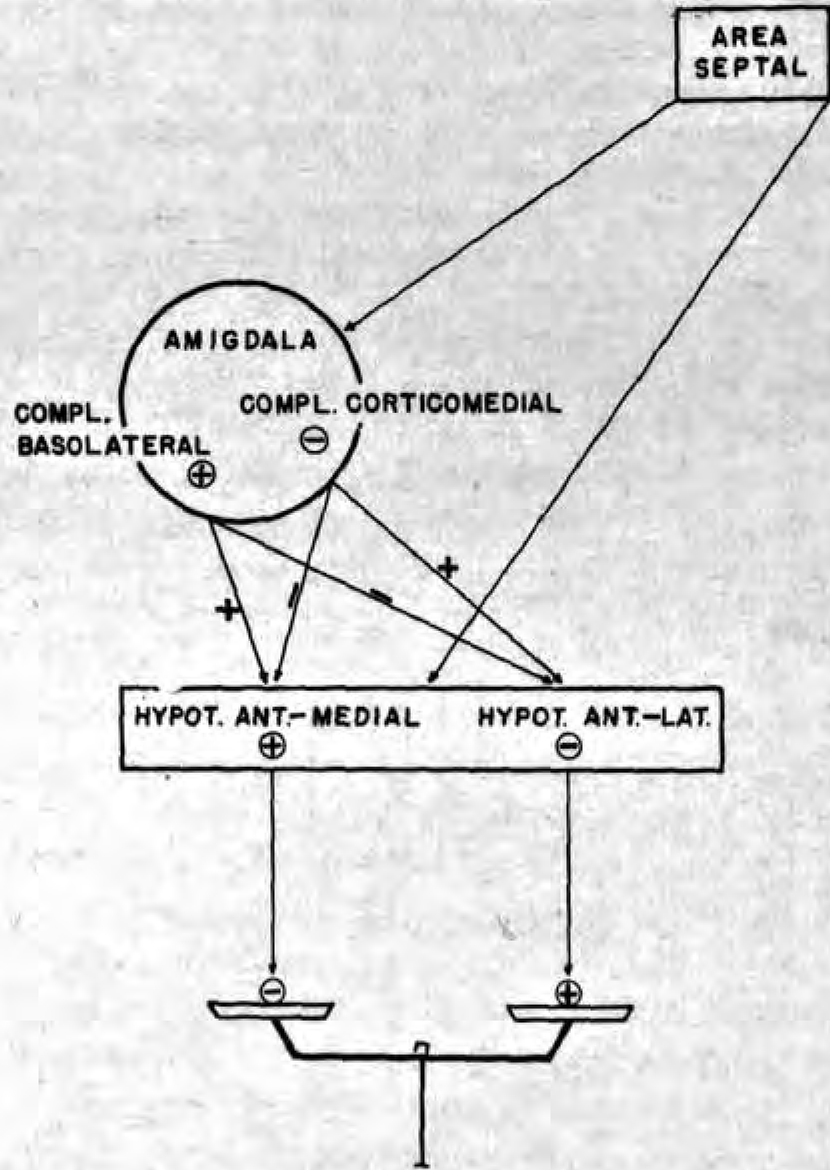


Fig. 7. Diagrama del circuito regulador de la ingestión de sodio. El hipotálamo es la estructura principal del circuito; el área septal y la amígdala son estructuras moduladoras de su actividad.

prepondera y el animal ingiere poca sal. Por el contrario, cuando la zona destruida es aquella que normalmente refrena al animal para ingerir sodio (—), el equilibrio se altera en sentido inverso y la rata ingiere más sodio. La misma situación se encuentra en la amígdala, pero esta estructura realiza su acción a través del hipotálamo al cual modula. El área septal ejerce una acción inhibidora sobre la ingestión de sodio, por eso su destrucción la aumenta y su estimulación eléctrica la disminuye (Gentil y col., 1971). Es una estructura dominante con respecto a la amígdala y solamente moduladora con respecto al hipotálamo. Este circuito debe integrarse desde ahora con el bulbo olfatorio, pues, como ya fue mencionado, su destrucción provoca un aumento de la ingestión de sodio (Chiaraviglio, 1969). Los estudios de su interacción con las otras estructuras están siendo realizados en nuestro laboratorio.

Bibliografía

Aguilar-Baturoni, H., Guevara-Aguilar, R. y Covian, M. R., Electrophysiological correlations of the structures that participate in the hidrosaline control. [En preparación].

Antunes-Rodrigues, J. y Covian, M. R., Variações do apetite específico para o cloreto de sódio em ratas hemidecorticadas. *Ciência e Cultura*, **12**: 96-97, 1960.

Chiaraviglio, E., Effect of lesions in the septal area and olfactory bulbs on sodium chloride intake. *Physiol. Behav.*, **4**: 693-697, 1969.

Covian, M. R., Apetito específico de las ratas suprarrenoprivas para el cloruro de sodio. *Rev. Soc. argent. Biol.*, **22**: 383-393, 1946.

Covian, M. R. y Antunes-Rodrigues, J., Specific alterations in sodium chloride intake after hypothalamic lesions in the rat. *Amer. J. Physiol.* **205**: 922-926, 1963.

Epstein, A. N y Stellar, E, The control of salt preference in the adrenalectomized rats. *J. comp. physiol.* **48**: 167-172, 1955.

Gentil, C. G., Papel da área septal no controle da ingestão de água e cloreto de sódio. Tese Docência-Livre, Faculdade de Farmácia e Odontologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 1972.

Gentil, C. G., Antunes-Rodrigues, J., Negro-Vilar, A. y Covian, M. R., Role of amygdaloid complex in sodium chloride and water intake in the rat. *Physiol. Behav.*, **3**: 981-985, 1968.

Gentil, C. G., Mogenson, G. J. y Stevenson, J. A. F., Electrical stimulation of septum hypothalamus, and amygdala and saline preference. *Am. J. Physiol.*, **220**: 1172-1177, 1971.

Grace, J. E., Central nervous system lesions and saline intake in the rat. *Physiol. Behav.*, **3**: 387-393, 1968.

Morgane, P. J., The function of the limbic and rhinic forebrain-limbic midbrain systems and reticular formation in the regulation of food and water intake. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **157**: 806-848, 1969.

Myers, K., Morphological changes in the adrenal glands of wild rabbits. *Nature*, **213**: 147, 1967.

Nauta, W. J. H., Limbic system and hypothalamus: anatomical aspects. *Physiol. Rev.*, **40**: 102-104, 1960.

Negro-Vilar, A., Gentil, C. G., Antunes-Rodrigues, J. y Covian, M. R., Influência do sistema límbico na ingestão de cloreto de sódio e água no rato. *Ciência e Cultura*, **17**: 253, 1965.

Negro-Vilar, A., Gentil, C. G., Antunes-Rodrigues, J. y Covian, M. R., Alterations in sodium chloride and water intake after septal lesions in the rat. *Physiol. Behav.*, **2**: 167-170, 1967.

Pibram, K. H., Limbic system. *En*: Electrical stimulation of the brain. D. E. Sheer (ed.) The Hogg Foundation for Mental Health, Austin, Texas: University Press, 311-328, 1961.

Raisman, G., The connections of the septum. *Brain*, **89**: 317-348, 1966a.

Raisman, G., Neural connections of the hypothalamus. *Br. med. Bull.*, **22**: 197-201, 1966b.

Raisman, G., An evaluation of the basic patterns of connections between the limbic system and hypothalamus. *Amer. J. Physiol.*, **129**: 197-202, 1970.

Richter, C. P., Increased salt appetite in adrenalectomized rats. *Amer. J. Physiol.*, **115**: 155-161, 1936.

Saad, W. A., Covian, M. R., Antunes-Rodrigues, J. y Gentil, C. G., Interacción entre la amigdala y el área septal en el control de la ingestión de sodio. Abstracts X Cong. latinoamer. Physiol. Sci. *Acta cient. venezolana*, **22**: (Supp. 2): R-59, 1971.

Saad, W. A., Antunes-Rodrigues, J., Gentil, C. G., y Covian, M. R., Interaction between hypothalamus, amygdala and septal area in the control of sodium chloride intake. *Physiol. Behav.*, **9**: 629-636, 1972.

CIENCIA, MÉX.
XXVIII (4) 155-62
31, Diciembre, 1973

REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA ACTIVIDAD DIURNA DEL ACOCIL *PROCAMBARUS*

Hugo Aréchiga U.

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional
Apdo. Postal 14-740, México 14, D. F.

Resumen

La actividad eléctrica en elementos neuronales del acocil *Procambarus* fluctúa a lo largo del nictámero siendo mas intensa durante la noche que en el día. Estas fluctuaciones se manifiestan en la actividad espontánea de receptores sensoriales, como de interneuronas aferentes y de motoneuronas, así como en las respuestas de estos elementos, a estímulos específicos. La actividad locomotriz y la respuesta motora a la luz varía en forma análoga. Este ritmo de actividad persiste aun en condiciones de iluminación o de obscuridad constantes, lo cual sugiere su naturaleza endógena. Los extractos de tallo ocular o de ganglio supraesofágico deprimen la actividad neuronal, lo cual sugiere que el ritmo es mantenido por la liberación de productos de neurosecreción. Por otra parte, el contenido de neurohormonas en el sistema nervioso presenta variaciones nictamerales, siendo mas elevado por la noche.

Summary

The electrical activity of single neurons of the crayfish *Procambarus* fluctuates along the 24-hour cycle, with a phase of high reactivity at night, and a phase of low reactivity at day-time. Spontaneous and evoked responses in sensory receptors and interneurones, as well as the activity in moteoneurones show similar variations. Locomotor activity and motor responses to light varies in the same manner. This rhythmicity persists under constant darkness or illumination and therefore seems to be of endogenous nature. Extracts from eyestalk or supraesophageal ganglion depress neuronal activity, and it is assumed then, that the circadian rhythm of neuronal activity is maintained though the release of neurosecretory products. On the other hand, neurohormonal content in eyestalk and supraesophageal ganglion, shows circadian variations, being higher at night.

Introducción

El cangrejo de río, conocido comunmente en México como "acocil", y que en el continente americano comprende como géneros principales a *Procambarus* y *Orconectes*, manifiesta en su ambiente natural un ritmo diurno de actividad, mismo que es conocido desde antiguo para el género europeo *Astacus*. Es sabido, así, que durante el día permanece en su madriguera, de la cual emerge al atardecer para desarrollar sus actividades locomotoras bajo condiciones escotópicas[29]. Este ritmo diurno, evidentemente ligado a la iluminación ambiental, persiste, sin embargo, aún en obscuridad o iluminación constantes a lo largo del nictámero. Kalmus[32], mediante registros actográficos de la actividad locomotora de acociles colocados durante varias semanas en obscuridad continua, demostró que los lapsos de actividad se sucedían durante la noche, permaneciendo los animales en reposo durante el día. Las características de este ritmo han sido analizadas ulteriormente y se admite que es de naturaleza endógena, y puede calificársele de "circadiano" o"circádico"[3,36].

La actividad locomotora no es, desde luego, la única función del acocil que muestra variaciones a lo largo del ciclo de 24 horas, aún en condiciones constantes de iluminación. Se han descrito ritmos semejantes en la posición del pigmento retiniano proximal[10] y del pigmento retiniano distal[43], los cuales, durante el día, se encuentran en posición de adaptación a la luz y, por la noche, en posición de adaptación a la obscuridad. La distribución de los pigmentos tegumentarios manifiesta un ritmo análogo[31]. El depósito de calcio en los gastrolitos se realiza durante la fase nocturna del nictámero[41] y el consumo de oxígeno es mayor durante las horas nocturnas[21,25].

Si bien la existencia de los ritmos diurnos antes mencionados ha sido confirmada repetida-

mente, la información acerca del substrato fisiológico de dichos ritmos es aún escasa. Desde la descripción inicial del ritmo locomotor, quedó de manifiesto la participación del tallo ocular en su mantenimiento. Así, la extirpación de ambos tallos oculares da lugar a la desaparición del ritmo de actividad diurna en *Potamobius astacus*. Por otra parte Kalmus[32] observó que la inyección de extractos de tallo ocular produce modificaciones en la actividad locomotora. Resultados análogos fueron obtenidos por Roberts[38] y Schallek[39] en *Orconectes*. Una diferencia importante, sin embargo, fue que, en tanto que en *Potamobius astacus* la extirpación de los tallos oculares determinaba disminución de la actividad locomotora, en *Orconectes* sobrevenía un aumento, reversible bajo la acción de los extractos. Tanto en el acocil como en otros crustáceos, se han obtenido ulteriormente datos congruentes con la noción de una substancia depresora de la actividad locomotriz, presente en el tallo ocular[12], posiblemente liberada en la llamada glándula sinusal, que es un órgano neurohemal, donde un conjunto de axones termina en la vecindad de un seno sanguíneo[26].

La postulación de una etapa hormonal en la regulación de la actividad circádica del acocil resulta congruente con el hecho de que, a las distintas funciones a las que se han descrito variaciones de esta naturaleza, también se les conoce como substratos de la acción hormonal del tallo ocular. Así, los pigmentos retinianos proximal y distal emigran hacia la posición de adaptación a la luz, aún cuando el animal se encuentre en la obscuridad, si se le inyectan extractos de tallo ocular, y hay datos que indican que la migración hacia la posición de adaptación a la obscuridad también es gobernada por una hormona [20,33]. La distribución de los pigmentos tegumentarios también depende de la iluminación ambiental, y este fenómeno es mediado por la liberación de hormonas del tallo ocular[18]. Se sabe, asimismo, que la extirpación de los tallos oculares produce aceleración de la ecdisis, lo que ha llevado a concluir que en estas estructuras existe una hormona inhibidora, la cual afecta al metabolismo del calcio[37].

El que la actividad locomotriz del acocil varíe a lo largo del ciclo de 24 horas, sugiere la presencia de un ritmo circádico en elementos neurales y, a continuación, se describirán algunos estudios que muestran la existencia de tal ritmo, así como de su modulación por efecto hormonal.

I. Modulación hormonal de la actividad del sistema nervioso

Existe ya evidencia suficiente de que la actividad del sistema nervioso del acocil es afectada por agentes humorales, los cuales actúan tanto de manera directa sobre elementos neurales, como de modo indirecto, afectando las condiciones de su estimulación natural, produciéndose así patrones bien definidos de acción, como se verá en los ejemplos siguientes:

1. *Modulación hormonal de la actividad sensorial*

Uno de los ejemplos más notables de la acción moduladora hormonal sobre la sensibilidad del acocil, lo da la influencia que se ejerce sobre los órganos sensoriales periféricos. Así, en el ojo compuesto, los extractos de tallo ocular o de glándula sinusal reducen la amplitud de la respuesta de los fotorreceptores retinianos a la luz, como se ilustra en la Fig. 1. En ese caso, se

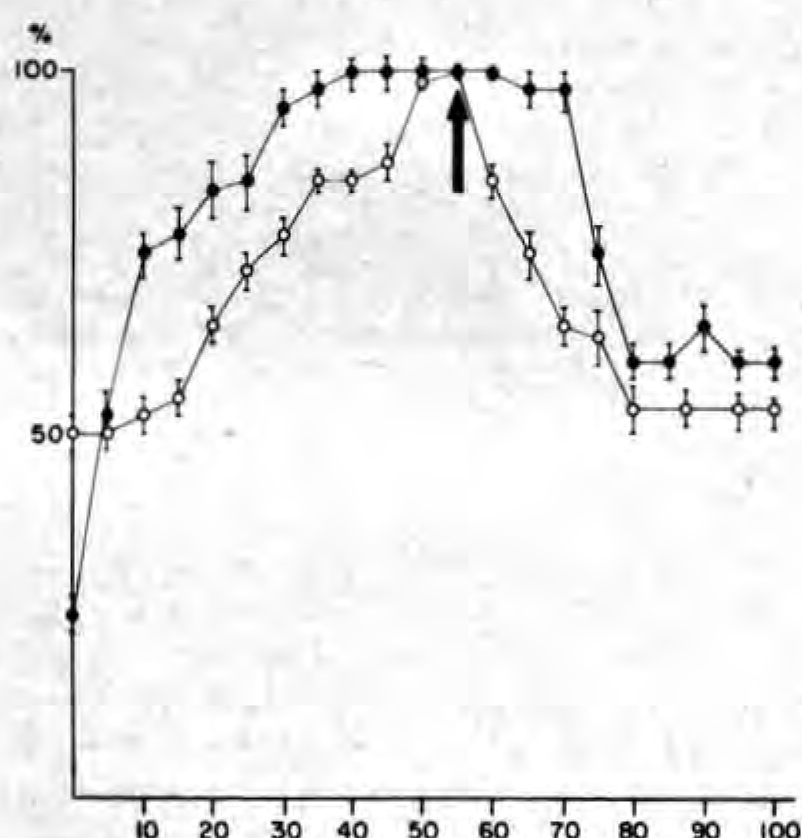


Fig. 1. Reducción de la amplitud del electrorretinograma (●—●) del acocil *Procambarus bouvieri*, correlativa a una reducción en el área de la pseudopupila, (o—o). Ambas magnitudes están expresadas en la ordenada, normalizadas con respecto al valor máximo alcanzado durante la adaptación a la obscuridad. Las barras verticales representan error estándar. Abscisa, tiempo, en minutos, durante el cual el animal estuvo adaptado a la obscuridad. La flecha indica el momento de la inyección de extracto de glándula sinusal.[8]

registró el electrorretinograma (ERG) que en el acocil es producido por las células retinulares[35], al parecer sin contribución alguna de otros elementos. Por otra parte, es sabido que la magnitud de la despolarización de los fotorreceptores ante un estímulo luminoso es función de

la intensidad de la luz aplicada y de la sensibilidad del receptor[33]. La depresión de la sensibilidad visual inducida por los extractos de tallo ocular se manifiesta, asimismo, en la respuesta de las interneuronas del nervio óptico. Son estos elementos los que conducen la información visual mas elaborada[44], y un grupo de estas neuronas, las llamadas *fibras de actividad sostenida*, responden a la aplicación de luz en su campo retiniano específico con un tren de impulsos, cuya frecuencia y duración dependen de la intensidad y duración del estímulo aplicado[47,48]. Son, muy posiblemente, los canales de información más importantes acerca de la intensidad luminosa[24]. Pues bien, como puede advertirse en la Fig. 2, la curva de reactividad a la luz en una neurona de *respuesta sostenida* manifiesta un desplazamiento hacia niveles de menor sensibilidad bajo los efectos de extractos de glándula sinusal. Por otra parte, la organización de los campos receptivos en la retina también depende de influencias hormonales. Así, Aréchiga y Yanagisawa[4] describieron expansión de los campos receptivos de las neuronas de respuesta sostenida al cabo de unos 20 minutos de adaptación a la obscuridad. Este fenómeno, como han demostrado Aréchiga, Fuentes-Pardo y Barrera-Mera[8], es suprimido por inyección de extractos de tallo ocular. Esta maniobra reduce, asimismo, la extensión de la retina que difunde un haz de luz. En suma, tal parece que en la modulación de la sensibilidad a la luz, ejercida par el tallo ocular, la migración de los pigmentos retinianos proximal y distal juega un papel determinante; sin embargo, es posible que exista también una acción directa sobre los elementos neuronales, ya que aún la frecuencia de descarga espontánea de interneuronas visuales, en condiciones de completa obscuridad, es suprimida por la aplicación de extractos de tallo ocular.

Un receptor sensorial en el que se ha demostrado susceptibilidad a la aplicación de extractos de tallo ocular, es el tensorreceptor abdominal, descrito por Alexandrowicz[1] y caracterizado funcionalmente por Wiersma, Furschpan y Florey[45]. En la Fig. 3 se muestra la acción depresora del extracto de tallo ocular aplicado

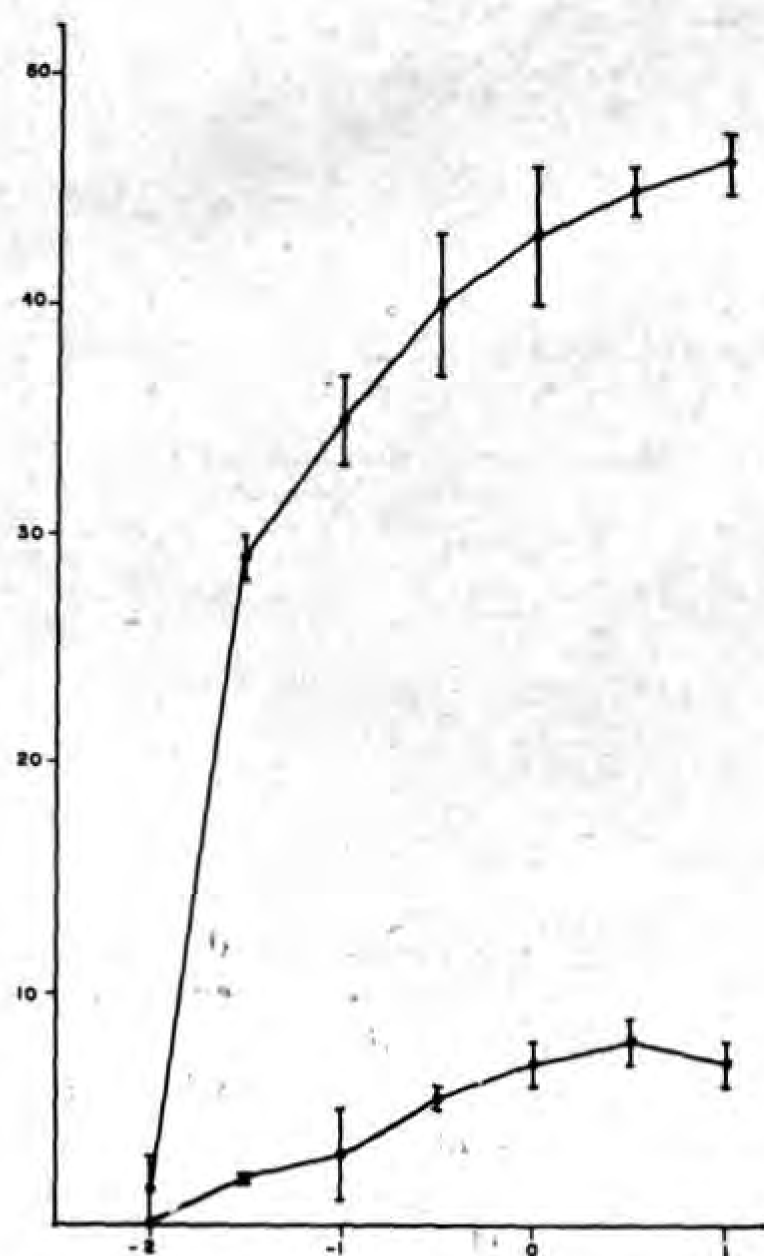


Fig. 2. Reducción de la respuesta a la luz en el acocil, por efecto de la inyección de extracto de glándula sinusal. Ordenadas, núm. de impulsos producidos en una neurona de acción sostenida (0-38) por aplicación de pulsos luminosos de 100 mseg. de duración, e intensidad variable según se indica en las abscisas, en unidades logarítmicas (bujía/m²). Cada punto representa el promedio de diez experimentos. Las barras indican error estándar. La curva superior corresponde a animales testigo. La inferior, al efecto de la inyección de extracto de glándula sinusal. En ambos casos, los animales estuvieron 45 minutos bajo adaptación a la obscuridad.

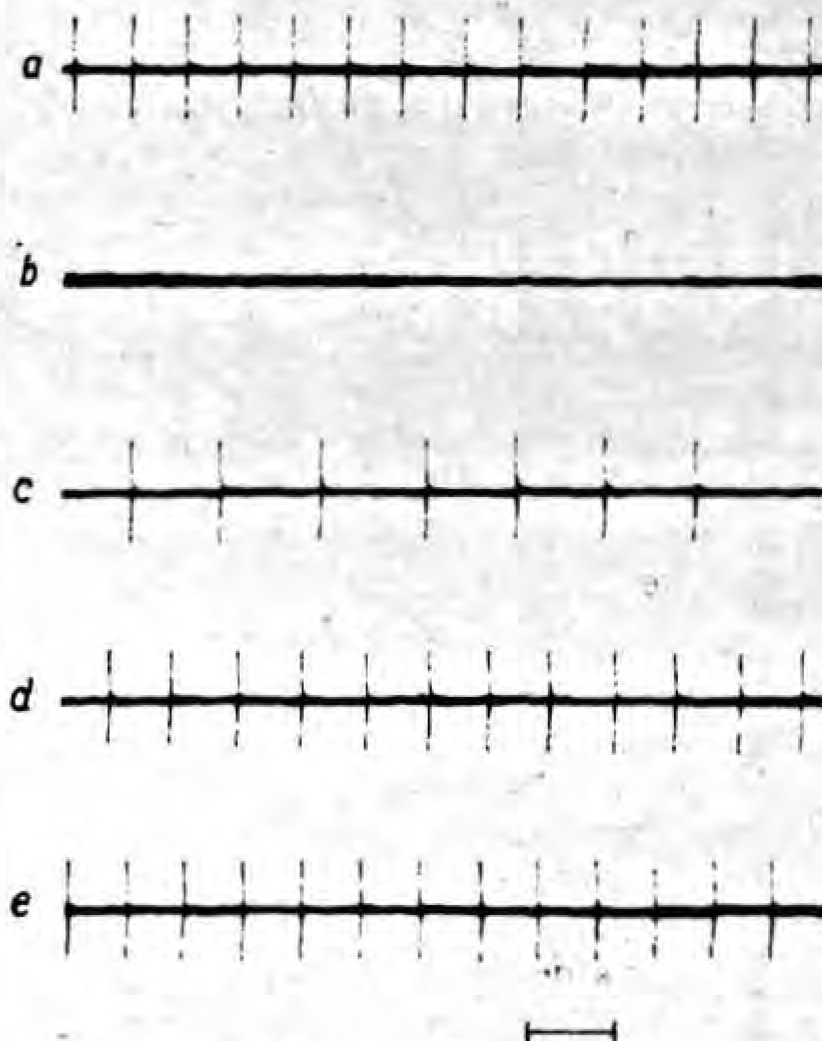


Fig. 3. Depresión de la respuesta tónica de un tensorreceptor abdominal aislado de acocil, sometido a tensión constante; *a*, registro testigo. Entre *a* y *b*, se aplicó tópicamente extracto de glándula sinusal. *c*, *d* y *e* corresponden a registros tomados a intervalos sucesivos de diez minutos. Señal de tiempo, 100 mseg.[3]

tópicamente, sobre la actividad del tensorreceptor abdominal de adaptación lenta. Esta neurona es capaz de mantener, durante lapsos muy prolongados, un ritmo constante de descarga al ser sometida a distensión continua. La frecuencia de su descarga es proporcional a la distensión aplicada. En 3,a se presenta un registro de actividad tónica, cuya frecuencia disminuye al aplicar el extracto (equivalente a 2 tallos oculares). Este efecto depresor se prolonga unos treinta minutos (3,b-d).

También en mecanorreceptores tegumentarios, que detectan desplazamiento de las sedas del exosqueleto, ha sido demostrada una acción depresora análoga[3].

2. *Acción humoral sobre la actividad de interneuronas y motoneuronas*

La aplicación de extractos de tallo ocular produce también efecto depresor sobre la actividad de interneuronas y de neuronas motoras. Así, en el acocil, un grupo de elementos que resultan interesantes a este respecto son las llamadas "*detectores de actividad*", que fueron descritas inicialmente por Wiersma y Mill[46]. Estas neuronas son activadas por la realización de movimientos en cualquier parte del cuerpo y su frecuencia de descarga es proporcional a la magnitud de la actividad motora. En animales con electrodos implantados en los tractos conectivos, se advierte que la inyección de extractos de tallo ocular induce una depresión prolongada de la frecuencia de descarga en estas neuronas, correspondiente a la depresión en la actividad motora global. Este estado de "quietud" inducido por los extractos de tallo ocular, se prolonga dos o más horas y afecta, no sólo a las motoneuronas que participan en la realización de movimientos ambulatorios, sino también a motoneuronas de músculos oculares. Asimismo, en ganglios aislados, la descarga espontánea de motoneuronas es deprimida por la acción de los extractos. En resumen, los datos disponibles indican que en el tallo ocular se libera una substancia que causa depresión general de la excitabilidad en el sistema nervioso del acocil, afectando a receptores sensoriales, interneuronas y motoneuronas y, además, se ejerce en forma sinérgica sobre efectores de tipo pararreceptor, como son los pigmentos retinianos accesorios, al reducir la cantidad de luz que llega a los receptores.

II. Ritmo circádico de actividad neural

En los distintos niveles de integración neural del acocil se han descrito variaciones circádicas de actividad. Así, la amplitud del ERG y la frecuencia de descarga en fibras de respuesta sostenida en el nervio óptico, varían a lo largo del ciclo de 24 horas[2], y el período circádico varía de 22 horas, en animales mantenidos en obscuridad continua, a 26 horas, si se les tiene bajo iluminación constante[3]. La frecuencia tónica de descarga en neuronas detectoras de actividad presenta variaciones similares. Este fenómeno ha sido igualmente descrito en la "cigala" o "maganto", crustáceo marino del género *Nephrops*[5], y el régimen de habituación en interneuronas táctiles es más pronunciado durante el día que por la noche, indicando así un cambio en la excitabilidad de estos elementos[7] (Fig. 4). Por otra parte, la actividad espontánea neuronal también varía a lo largo del ciclo de 24 horas; así, la descarga tónica de 1 a 5 impulsos por segundo, que se observa en interneuronas visuales al cabo de un lapso de varias horas de privación de luz, es más intensa durante la noche que durante el día[2].

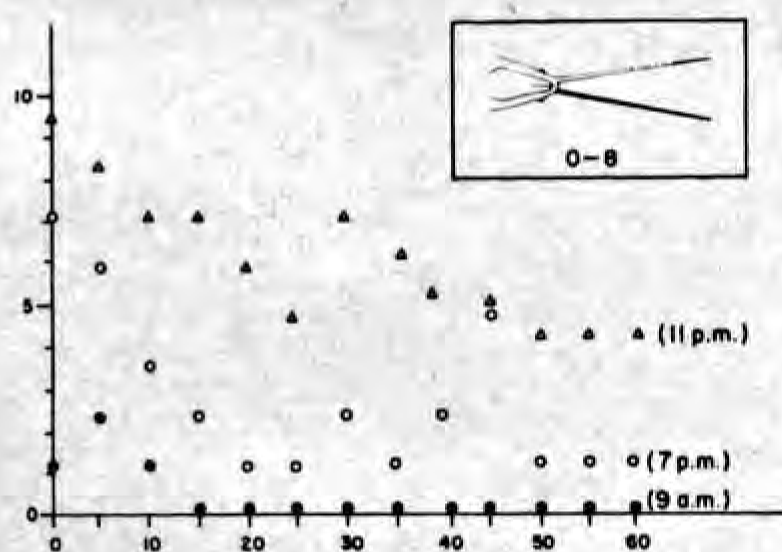


Fig. 4. Variaciones diurnas en la habituación de la respuesta de una interneurona mecanorreceptiva (0-8) de acocil, cuyo campo sensorial cubre la antena homolateral, como se indica en el recuadro de la figura. Ordenada, núm. de espigas producido por la aplicación de un estímulo mecánico. Abscisa, tiempo de estimulación, en minutos, a régimen de un estímulo cada cinco segundos. Cada punto corresponde a una muestra tomada cada cinco minutos.[7]

Estos datos sugieren la presencia en el tallo ocular de una substancia depresora de la actividad del sistema nervioso, cuya liberación obedece a un ritmo circádico y que, al pasar a la sangre en mayor cantidad durante el día, determina que el nivel de excitabilidad sea menor en esta fase del nictámero.

III. Actividad endócrina en el sistema nervioso del acocil

Desde la descripción original de Hanström[26], se admite que la llamada *glándula sinusal* es

un reservorio de productos de secreción. Al surgir el concepto de neurosecreción y afinarse los estudios histológicos, ha quedado establecido que esta estructura carece de actividad secretora propia y, de hecho, los estudios de su ultraestructura han mostrado la ausencia de células secretoras propiamente dichas[13]; en cambio, la imagen predominante (Fig. 5) es la de un conjunto de axones bulbosos, llenos de gránulos de neurosecreción de 500 a 2 000 Å de diámetro que, de acuerdo con su tamaño, forma y densidad óptica, han sido clasificados en cinco grupos, lo cual sugiere que los distintos efectos producidos por extractos de glándula sinusal pudieran ser atribuibles a substancias distintas, almacenadas en gránulos morfológicamente diferenciables; sin embargo, no hay datos experimentales que permitan fundamentar esta suposición. Las terminaciones nerviosas de naturaleza secretora terminan en contacto con un seno sanguíneo, al cual es de suponer que vierten sus productos. En este sentido, entonces, la glándula sinusal, como postularan Hanström[27] y los Scharrer[40], resulta análoga al cuerpo cardíaco de los insectos y a la neurohipófisis de los vertebrados.

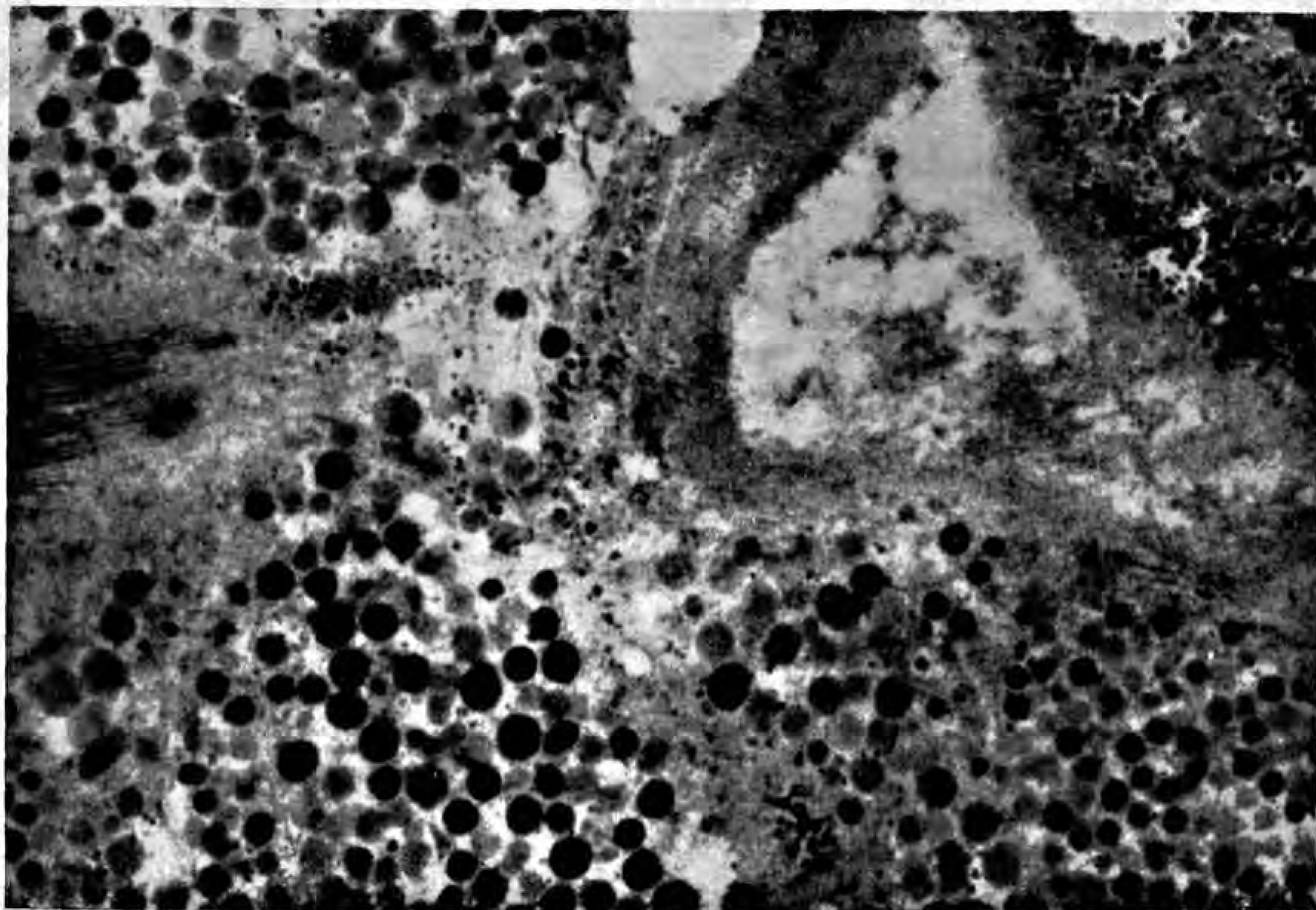


Fig. 5. Fotomicrografía electrónica de glándula sinusal de acocil *Procambarus bouvieri*, donde se muestran gránulos de neurosecreción de distintos tamaños y densidades ópticas. Ampliación, × 12500. (Cortesía de R. Flores y E. Vázquez-Nyn, del Instituto Nacional de Cardiología, de México).

El origen de las fibras que terminan en la glándula sinusal ha sido estudiado inicialmente mediante técnicas morfológicas y se sabe, así, que los somas de origen se encuentran en los ganglios visuales del tallo ocular[11,15], particularmente en una estructura conocida como órgano X u órgano de Bellonci[22] y que se encuentra adosado a la *medulla terminalis*, que es la última de las cuatro capas ganglionares. Esta disposición morfológica ha sido confirmada con técnicas electrofisiológicas, ya que la aplicación de estímulos eléctricos en los somas de estas neuronas secretoras produce potenciales de acción susceptibles al registro unitario en las terminaciones de la glándula sinusal[30]. Pero, además de los ganglios visuales, existen axones que, provenientes del ganglio supraesofágico, y aún de ganglios de la cadena torácica, terminan en la glándula sinusal, a la que llegan discurriendo por el nervio óptico. No existe información alguna acerca de si los distintos tipos de células neurosecretoras, morfológicamente identificadas, presentan alguna diferenciación en el tipo de secreción[13]. Por otra parte, el hecho de que en diversas partes del sistema nervioso se encuentre actividad de una misma hormona[33,42] proba-

blemente indica falta de centralización en la síntesis hormonal.

Es posible que la liberación de las substancias de neurosecreción en la glándula sinusal sea inducida, como en otras células neurosecretoras, por la llegada de impulsos nerviosos propagados hasta las terminaciones. Así, la estimulación eléctrica reiterada del tallo ocular[13] reduce la cantidad de gránulos de neurosecreción; por otra parte, los potenciales de acción han sido registrados por Iwasaki y Satow[30] quienes sugieren que la liberación de hormonas también puede tener lugar en el soma de las neuronas secretoras. En el mecanismo de libeción, los iones de calcio parecen jugar un papel determinante. Acerca de la forma de la liberación, estudios ultraestructurales han mostrado[13] la presencia de cambios compatibles con un fenómeno de exocitosis. Así pues, las hormonas serían sintetizadas en el soma neuronal, para luego, mediante flujo axoplásmico, ser conducidas hasta sus terminaciones en la glándula sinusal. En el caso de las fibras que proceden del ganglio supraesofágico, Fingerman y Aoto[19], han observado acumulación de neurosecreciones en el cabo proximal del nervio óptico seccionado en el acocil enano *Cambarellus shufeldtii.*

En cuanto a la naturaleza química de las hormonas liberadas en la glándula sinusal, la información disponible hasta ahora, principalmente por estudios en otras especies de crustáceos, sugiere su naturaleza proteínica. Una de estas hormonas, la que produce hiperglucemia, ha sido caracterizada como una proteína no dializable[34]; en cambio, una de las hormonas estimulantes de los cromatóforos, en el camarón *Pandalus borealis* ha sido identificada como un péptido pequeño, por Fernlund y Josefsson[17].

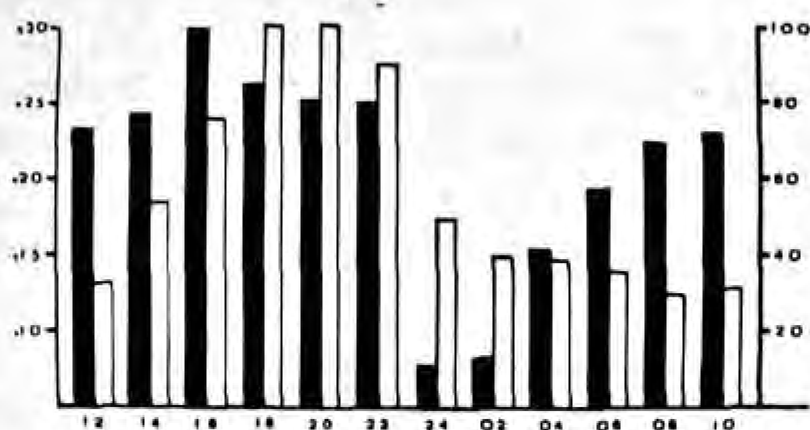


Fig. 6. Variaciones diurnas correlativas en la cantidad de hormona inductora de la adaptación a la luz al pigmento retiniano distal del acocil *Procambarus bouvieri* (barras negras) y en el área de la pseudopupila (blancas). Ordenadas, izquierda, densidad óptica en unidades arbitrarias de la banda relacionada con la hormona; derecha, área de la pseudopupila, normalizada con respecto al valor máximo. Abscisa, hora del día, iniciándose al cabo de 48 horas de permanencia en la obscuridad.[9]

También de naturaleza peptídica, con peso molecular algo mayor, parece ser la hormona que promueve la migración del pigmento retiniano distal en *Pandalus*[16], en otras especies de crustáceos y en el propio acocil[28] la estructura química de esta hormona se considera análoga. En cuanto a la hormona que deprime la actividad del sistema nervioso, ha sido caracterizada en el cangrejo de mar *Carcinus maenas* como un péptido dializable y termoestable[6]. Datos preliminares en el acocil *Procambarus bouvieri* (Barrera-Mera, observación no publicada) sugieren que también en esta especie se trata de una molécula pequeña.

IV. Variaciones circádicas del contenido hormonal

Un dato imprescindible para fundamentar la hipótesis hormonal de las variaciones circádicas en la actividad de los distintos órganos, blanco de la glándula sinusal, es la demostración de que la cantidad de las hormonas correspondientes varía a lo largo del ciclo de 24 horas. Con este propósito, se han realizado algunos experimentos sobre la hormona promotora de la adaptación a la luz en el pigmento distal del acocil *Procambarus.* Esta hormona ha sido separada por electroforesis en gel[9], asociada a bioensayos y, como puede observarse en la Fig. 6, de animales mantenidos en la obscuridad continua durante 48 horas se manifiestan claras diferencias en la densidad de la banda correspondiente a esa hormona, a lo largo del ciclo de 24 horas. Estas variaciones de contenido hormonal afectan también a otras hormonas y se manifiestan, no sólo en la glándula sinusal, sino también en otras regiones del sistema nervioso. Aún no puede hacerse ningún pronunciamiento definitivo, en cuanto a si este ritmo circádico de la cantidad de neurohormonas en el acocil sea debido a variaciones en la síntesis o liberación de las hormonas.

De los datos presentados puede inferirse que algunas funciones del acocil, que, en condiciones naturales, están gobernadas por hormonas producidas por elementos nerviosos y liberadas en la glándula sinusal, son moduladas en forma fásica por estímulos que desencadenan la liberación hormonal y, a lo largo del nictámero, uno de los estímulos más importantes es la iluminación ambiental. Por otra parte, la producción de estas hormonas manifiesta un ritmo endógeno, capaz de mantenerse durante varios días en condiciones ambientales constantes.

Bibliografía

1. Alexandrowicz, J. S., Muscle receptor organs in the abdomen of *Homarus vulgaris* and *Palinurus vulgaris*. *Quart. J. Microscop. Sci.*, **92**: 163-199, 1951.
2. Aréchiga, H. y Wiersma, C. A. G., Circadian rhythm of activity in the crayfish visual units. *J. Neurobiol.*, **1**: 71-85, 1969.
3. Aréchiga, H., Fuentes, B. y Barrera, B., Circadian rhythm of responsiveness in the visual system of the crayfish. En "Neurobiology of Invertebrates". J. Salanki, Ed. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences. Budapest, 1973, pp. 403-421, 1973.
4. Aréchiga, H. y Yanagisawa, K., Inhibition of visual units in the crayfish. *Vision Res.*, **13**: 731-744, 1973.
5. Aréchiga, H. y Bailey, H., An accurate and simple method of analysis of neuronal activity. *Marine Physiol. and Behav.*, (en prensa).
6. Aréchiga, H., Huberman, A. y Naylor, E., Hormonal modulation of circadian neural activity in the crab *Carcinus maenas*. *Proc. Roy. Soc.* (Ser B), (en prensa).
7. Aréchiga, H., Barrera-Mera, B. y Fuentes-Pardo, B., Habituation of mechanoreceptive interneurons of the crayfish. (En preparación).
8. Aréchiga, H., Fuentes-Pardo, B. y Barrera-Mera, B., Influence of retinal shielding pigment on light sensitivity in the crayfish. (En preparación).
9. Aréchiga, H. y Mena, F., Circadian rhythm of hormone content in the nervous system of the crayfish. (En preparación).
10. Bennitt, R., Diurnal rhythm in the proximal pigment cells of the crayfish retina. *Physiol. Zoöl.*, **5**: 65-69, 1932.
11. Bliss, D. E., Durand, J. B. y Welsh, J. H., Neurosecretory systems in decapod crustacea. *Z. Zellforsch. u. mikroskop. Anat.*, **39**: 520-536, 1954.
12. Brown, F. A. Jr., Physiological Rhythms. En "The Physiology of Crustacea", T. H. Waterman, Ed. Academic Press, 1961, Vol. II, pp. 401-430.
13. Bunt, A. H. y Ashby, E. A., Ultrastructure of the sinus gland of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **9**: 334-342, 1967.
14. Bunt, A. H. y Ashby, E. A., Ultrastructural changes in the crayfish sinus gland following electrical stimulation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **10**: 376-382, 1968.
15. Durand, J. B., Neurosecretory cell types and their secretory activity in the crayfish. *Biol. Bull.*, **111**: 62-76, 1956.
16. Fernlund, P., Chromactivating hormones of *Pandalus borealis*. Isolation and purification of a light-adapting hormone. *Biochim. biophys. Acta*, **237**: 519-529, 1971.
17. Fernlund, P. y Josefsson, L., Chromactivating hormones of *Pandalus borealis*: Isolation and purification of the "red-pigment-concentrating" hormone. *Biochem. biophys. Acta.*, **158**: 262-273, 1968.
18. Fingerman, M., Comparative Physiology: Chromatophores. *Ann. Rev. Physiol.*, **32**: 345-372, 1970.
19. Fingerman, M. y Aoto, T., Effects of eyestalk ablation upon neurosecretion in the supraoesophageal ganglia of the dwarf crayfish *Cambarus shufeldtii*. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, **79**: 68-74, 1960.
20. Fingerman, M., Krasnow, R. A. y Fingerman, S. W., Separation, assay and properties of the distal retinal light-adapting and dark-adapting hormones in the eyestalks of the prawn *Palaemonetes vulgaris*. *Physiol. Zoöl.*, **44**: 119-128, 1971.
21. Fingerman, M. y Lago, A., Twenty-four hour rhytms of metabolic rate and locomotor activity in the crayfish *Orconectes clypeatus*. *Anat. Rec.*, **125**: 616, 1956.
22. Gabe, M., Neurosecretion. Pergamon Press, 1966.
23. Glantz, R. M., Light-adaptation in the photoreceptor of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Vision Res.*, **8**: 1407-1421, 1968.
24. Glantz, R. M., Peripheral versus central adaptation in the crustacean visual system. *J. Neurophysiol.*, **34**: 485-492, 1971.
25. Guyselman, J. B., Solar and lunar rhythms of locomotor activity in the crayfish, *Cambarus virilis*. *Physiol. Zoöl.*, **30**: 70-87, 1957.
26. Hanström, B., Die Sinusdrüse und der hormonal bedingte Farbwechsel der Crustaceen. *Kungl. Svenska Vetenskap. Handl.* **16**: 1-99, 1937.
27. Hanström, B., Neurosecretory pathways in the head of Crustacea, Insecta and Vertebrates. *Nature*, **171**: 72-73, 1953.
28. Huberman, A., Barrera-Mera, B. y Aréchiga, H., Aislamiento y purificación de la hormona del pigmento distal del acocil *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Res. IX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Guanajuato, Gto., 1972.
29. Huxley, T. H., The crayfish. Appleton and Co., New York, 1880.
30. Iwasaki, S. y Satow, Y., Sodium-and calcium-dependent spike potentials in the secretory neuron soma of the X-organ of the crayfish. *J. Gen. Physiol.*, **57**: 216-238, 1971.
31. Kalmus, H., Über einen latenten physiologischem Farbwechsel Flusskrebs, *Potamobius astacus*, sowie seine hormonale Beeinflussung. *Z. Vergl. Physiol.*, **25**: 784-797, 1938.
32. Kalmus, H., Das Aktrogram des Flusskrebses und seine Beeinflussung durch Organextrakte. *Z. Vergl. Physiol.*, **25**: 798-802, 1938.
33. Kleinholz, L. H., Hormonal regulation of retinal pigment migration in crustaceans. En "The Functional Organization of the Compound Eye". C. G. Bernhard, Ed. Pergamon Press, 1966, pp. 89-101.
34. Kleinholz, L. H., Separation and purification of crustacean eyestalk hormones. *Am. Zool.*, **6**: 161-167, 1966.
35. Naka, K. y Kuwabara, M., Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Expt. Biol.*, **36**: 51-61, 1959.
36. Page, I. L., y Larimer, J. L., Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. *J. Comp. Physiol.*, **78**: 107-120, 1972.
37. Passano, L. M., Molting and its control En "The Physiology of Crustacea". T. H. Waterman, Ed. Academic Press, 1960, Vol. I, pp. 450-471.
38. Roberts, T. W., Evidences that hormonal inhibition of locomotion occurs for the crayfish *Cambarus virilis* Hagen. *Anat. Rec.* (Suppl.), **81**: 46-47, 1941.
39. Schallek, W., Some mechanisms controlling locomotor activity in the crayfish. *J. Exp. Zool.*, **91**: 155-156, 1942.
40. Scharrer, B. y Scharrer, G., Neurosecretion: 6, A comparison between the Intercerebralis-cardiacum-allatum system of the insects and the hypothalamo-

hypophyseal system of the vertebrates. *Biol. Bull.*, **87**: 242-251, 1944.

41. Scudamore, H. H., The influence of the sinus glands upon molting and associated changes in the crayfish. *Physiol. Zool.*, **20**: 187-208, 1947.

42. Trinidad Zúñiga, B., García de Kubli, M., Fuentes-Pardo, B. y Aréchiga, H., Modulación hormonal del pigmento accesorio del acocil. Res. XV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, San Cristóbal las Casas, Chis., Méx., 1972 p. 25.

43. Welsh, J. H., The sinus glands and 24-hour cycles of retinal pigment migration in the crayfish. *J. Exptl. Zool.*, **86**: 35-49, 1941.

44. Wiersma, C. A. G., Visual Central Processing in Crustaceans. En "Invertebrate Nervous System". C. A. G. Wiersma Ed., The University of Chicago Press, 1967, pp. 269-284.

45. Wiersma, C. A. G., Furschpan, E. y Florey, E., Physiological and pharmacological observations on muscle receptor organs of the crayfish, *Cambarus clarkii*, Girard. *J. Exptl. Biol.*, **30**: 136-150, 1953.

46. Wiersma, C. A. G. y Mill, P. J., "Descending" neuronal units in the commissure of the crayfish central nervous system, and their integration of visual, tactile and propioceptive stimuli. *J. Comp. Neurol.*, **125**: 67-94, 1965.

47. Wiersma, C. A. G. y Yamaguchi, T., The neuronal components of the optic nerve of the crayfish, as studied by single unit analysis. *J. Comp. Neurol.*, **128**: 333-358, 1966.

48. Wiersma, C. A. G. y Yamaguchi, T., Integration of visual stimuli by the crayfish central nervous system. *J. Exptl. Biol.*, **47**: 409-431, 1967.

CIENCIA, MÉX.
XXVII (4) 163-75
31, Diciembre, 1973

EL PAPEL DEL AMP CICLICO EN LA FUNCION SINAPTICA

ALEJANDRO BAYÓN CASO, VÍCTOR ALEMÁN ALEMÁN y JORGE MOLINA TORRES

Sección de Neurobiología, Departamento de Bioquímica,
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados,
Instituto Politécnico Nacional,
México 14, D. F.

RESUMEN

Desde su aparición en el campo del conocimiento, el AMPc cíclico se ha visto envuelto en gran cantidad de procesos asociados con los efectos hormonales. Debido a los abundantes y sugerentes caracteres que comparten la comunicación por vía hormonal y la transmisión sináptica y, fundamentalmente, porque el cerebro contiene los más altos niveles de AMP cíclico encontrados en órgano alguno, se ha hecho evidente la necesidad de conocer el papel que este segundo mensajero pueda desempeñar en fenómenos como la comunicación interneuronal, los *neurotrofismos* y la *neuroplasticidad*. Este trabajo se ha realizado con la intención de ofrecer una visión de conjunto de las tendencias que siguen en la actualidad los estudios en este campo.

SUMMARY

Since cyclic AMP came into ambitus of science, it has been involved in many biological processes associated with hormonal effects. Because of the numerous and suggestive features that share both hormonal communication and synaptic transmission, and mainly because the brain has the largest cyclic AMP levels found in any other organ, it has become evident the necessity to know the role that this *second messenger* might play in phenomena such as interneuronal communication, neurotrophisms and neuroplasticity. This work has been undertaken with the purpose to present a general view of the present approaches to this field.

La investigación de los mecanismos que determinan el funcionamiento de un órgano tan complejo como el cerebro es enormemente difícil, pero promete también inimaginables recompensas intelectuales y prácticas. Aunque la meta última, la explicación del comportamiento humano en términos fisicoquímicos, esté lejos de ser alcanzada en un futuro cercano, ya se empieza a acumular información sobre los medios que utiliza el sistema nervioso para transmitir e integrar los impulsos eléctricos, permaneciendo aún en la obscuridad los mecanismos que permiten el almacenamiento y la utilización de la información.

En relación a lo anterior, una de las áreas de investigación que ha experimentado un crecimiento explosivo en los últimos 8 años se preocupa del papel que pueda jugar el AMP cíclico (AMPc) en la función cerebral. Desde que Earl W. Sutherland descubrió en 1957[1] el Adenosin 3'-5' monofosfato cíclico (AMPc) y su papel como segundo mensajero para las hormonas epinefrina y glucagon, esta substancia, omnipresente en las especies biológicas y en los distintos tejidos de una misma especie, ha dejado ver su trascendental importancia en numerosos mecanismos de tipo regulatorio, como organizador intracelular de la respuesta a las señales hormonales que coordinan funciones intercelular e intertisularmente.

Aunque se ha observado que la formación y degradación de este metabolito parece regulada, al menos en parte, por los mismos factores que afectan o intervienen en la transmisión de impulsos por las neuronas (especialmente los neurotransmisores), aún no aparecen claras las funciones que puede desempeñar en el tejido nervioso, e incluso en los aspectos más frecuentemente abordados existen inseguridad e ideas contrapuestas. Además, la amplísima información sobre el campo está aún excesivamente dispersa y la falta de comunicación entre los investigadores de temas afines favorece la redundancia, el uso de nomenclaturas difícilmente reconciliables y las interpretaciones extravagantes. Por ello, lo que pretendiera ser una revisión monográfica

del campo, deberá concretarse a reseñar las ideas que actualmente dominan los intereses de los investigadores sobre el papel del AMPc en la transmisión sináptica.

Regulación de los niveles del AMPc en el tejido nervioso

El sistema del AMP cíclico

Antes de revisar las funciones que parece desempeñar el AMPc en el tejido nervioso*, es necesario familiarizarse con el mecanismo que regula su nivel en el mismo, ya que el estudio de este último fue lo que sugirió cuáles podían ser los objetivos neurobiológicos de los cambios de concentración de este segundo mensajero. El mecanismo de regulación puede dividirse operacionalmente en dos componentes: uno es el sistema enzimático (llamado sistema del AMPc) que cataliza la producción y destrucción del AMPc; el otro es el conjunto de efectores (llamados aquí factores moduladores) que, regulando la actividad del sistema enzimático, controla indirectamente los niveles del segundo mensajero.

El sistema del AMP cíclico comprende las enzimas adenilciclasa (AC) y fosfodiesterasa (FDE) que, respectivamente, constituyen las vías de síntesis y degradación de este metabolito, y ambas se encuentran en más altas concentraciones en cerebro que en otros órganos[3,4]. La adenilciclasa del sistema nervioso es, como todas las aisladas en otros tipos celulares, una enzima membranal que se encuentra concentrada en las membranas sinápticas aisladas de sinaptosomas[5], fundamentalmente en las postsinápticas[6]. Durante la ontogenia, la actividad de AC de cerebro (rata) aumenta, en base a proteínas, hacia el vigésimo día después del nacimiento y luego decae ligeramente. Este aumento coincide con el tiempo de proliferación de sinapsis y de actividad eléctrica cortical[7,8].

La AC parece constar de dos subunidades, una propiamente catalítica, que convierte ATP-Mg en Adenosin 3'-5' monofosfato y pirofosfato, y otra regulatoria que, unida a la primera, inhibe su actividad**. Este complejo dimérico, catalíticamente inactivo, debe ser separado para alcanzar la consecuente activación enzimática. Como se verá después, parece demostrado que la interacción hormona-receptor y "bloqueador"– receptor, activan e inhiben, respectivamente, tanto la AC como la respuesta eléctrica (por ejemplo, véanse[10] y [11]) disociando o asociando más fuertemente, según sea el caso, las subunidades de la enzima. En este apartado trataremos brevemente los factores "no hormonales" que intervienen en esta disociación, ya que los hormonales, son materia del tema subsecuente. Apuntamos, además, que existen factores que pueden regular la actividad del sistema sintetizador sin afectar la afinidad entre las subunidades de la AC, y otros cuyo modo de acción sobre el sistema aún se desconoce.

La homogenización del tejido nervioso disminuye la actividad de la AC, tanto basal como evocada por hormonas[12], inactivación que puede ser aún mayor si a la fracción membranal se le extraen lípidos o es tratada con lipasas. Esta última pérdida en actividad puede ser recuperada diferencialmente, esto es, regenerando independientemente la capacidad de "unión" a hormonas de la unidad regulatoria o bien la actividad enzimática basal de la unidad catalítica, si se adicionan al sistema diferentes fosfolípidos y detergentes[12]. La AC de homogenado (particulada) es activada por congelamiento y descongelamiento alternados o por iones fluoruro[12], siendo el efecto de estos últimos muy probablemente debido a que separan directamente ambas subunidades, ya que los bloqueadores del receptor no afectan esta activación, los activadores no tienen efecto aditivo sobre la respuesta máxima a estos iones, y éstos aumentan la V máxima, pero no alteran el Km (ATP) ni el Ka (Mg) de la enzima[13]. De difícil interpretación es el hecho de que la AC de homogenado dispersa con detergentes se inhibe con fluoruro y, tanto seroalbúmina bovina como DTT (Ditiotreitol), parecen estabilizarla[14]. La actividad de AC inducida por fluoruros en homogenado y por neurotransmisores en rebanadas de cerebro, se inhibe con sales de Litio[15]. También se desconoce la razón por la cual el cobre y el zinc son fuertes inhibidores de las AC[16, 17]. Tanto en células íntegras como en homogenado se han estudiado los que parecen ser los iones que la regulan en condiciones fisiológicas: el magnesio (o el manganeso, en su

* Una revisión amplia de la regulación y la función del AMPc en otros tejidos, fue publicada por Robison, Butcher y Sutherland en 1971[2]. Los recientes estudios sobre el Guanosin 3'-5' monofosfato cíclico (GMPc), que parece ser muy semejante en sus potencialidades del AMPc, sólo serán mencionados incidentalmente y cuando sea necesario, ya que los datos a él concernientes aún son escasos.

** Todo parece indicar que la subunidad regulatoria sea la misma con los hipotéticos receptores hormonales. En el cerebro no se ha demostrado como en otros tejidos (por ejemplo[9]) que varias unidades regulatorias pueden interaccionar, intercambiándose, con una sola subunidad catalítica modular.

defecto) es necesario para una óptima actividad de la AC[17], ya que, al formar un complejo con el substrato ATP, le permite interaccionar con el sitio activo de la enzima[18]. Cuando la relación ATP-Mg es mayor de 1, la AC se inhibe[13]. Por otro lado, el Mg parece activar no competivamente la enzima[13].

El calcio eleva el nivel de AMPc en el tejido nervioso[19], lo que correlaciona con datos obtenidos de AC de otros tejidos (por ejemplo[20,21]) en los que pequeñas cantidades de Ca^{++} son necesarias para la acción estimuladora de ciertas hormonas. La ausencia de Ca^{++} por acción de EGTA inhibe no competitivamente la AC de cerebro[18]. Se ha podido probar que el Ca^{++} es necesario para la "comunicación" entre el receptor y la unidad catalítica, aunque, en su ausencia, la activación por F^- persiste. Sin embargo, el C^{++} en exceso impide esta "comunicación" así como la activación de la unidad catalítica en otros tejidos (por ej.[22]). Parece ser que el Ca^{++} intracelular es el que se utiliza fisiológicamente en estos mecanismos[23].

La fosfodiesterasa (FDE), enzima que hidroliza (inactivando) el AMPc a 5'-AMP, ha sido estudiada, tanto en su estructura como en su mecanismo, con menos intensidad que la AC. En la corteza cerebral de rata aumenta durante los primeros 10 a 20 días después del nacimiento[7,24], aunque también se ha reportado que permanece prácticamente constante[8]. La enzima en el cerebro es 50% particulada y 50% soluble, encontrándose en gran parte (70% de la fracción particulada[25]) concentrada en terminales nerviosas[5,24,26]. Aunque se la ha hallado presinápticamente[27], existe evidencia histoquímica de su localización postsináptica[28,29].

La actividad de fosfodiesterasa parece tener su asiento en más de una enzima, al menos en el cerebro. En el de rata se han separado por cromatografía en agarosa dos actividades con Km_s diferentes para AMPc, y otra con más alta afinidad por GMPc que por AMPc[30]. Correlacionando aproximadamente con esto, en sephadex se separan dos picos de actividad: uno, Mg-Ca dependiente, que hidroliza preferentemente AMPc, otro, Mg dependiente Ca independiente, que destruye tanto AMPc como GMPc[31]. En corazón, el primer pico puede actuar como el segundo por acción del β-mercaptoetanol. Aquí es digno de notarse que tanto GMPc como AMPc parecen inhibir cada uno la hidrólisis enzimática del otro[32], aunque el GMPc a bajas concentraciones activa la hidrólisis del AMPc y por su parte el AMPc, a bajas concentraciones, también parece activar la hidrólisis del GMPc[33]. Según Changeux, esto se explicaría por un fenómeno de cooperatividad positiva del substrato, si la enzima es alostérica. Con base en esto se justificaría el hecho de que Tritón X-100 bloquée el efecto estimulador del GMPc (quizá por disociación de subunidades enzimáticas de la FDE) y que las metilxantinas y derivados de la adenina inhiban la actividad de la enzima (la cafeína inhibe competitivamente pero el efecto de la teofilina parece corresponder a una inhibición más compleja[32]).

Aún cuando, por lo hasta aquí apuntado, pudiera parecer que la actividad de FDE fuera susceptible de reducirse a dos tipos enzimáticos o quizás hasta a uno sólo con formas intercambiables, el problema es aún bastante complicado, ya que electroforéticamente se separan cinco picos de actividad de FDE (siendo sólo el pico 2 activable por Ca^{++}) y un pico activador no dializable que afecta de manera diferente a cada actividad separada[34]. Otros grupos han detectado un activador (¿el mismo?) resistente a temperatura y urea, pero sensible a enzimas proteolíticas y que se pierde durante la purificación de la enzima[35]; sin embargo, la FDE se estimula con tripsina[35]. El calcio estimula la actividad enzimática, estímulo que requiere de un factor termoestable no dializable que aumenta Km y V max de la FDE[19]. De acuerdo con esto, el EGTA inhibe la actividad enzimática, efecto que desaparece al incubar con tripsina, hecho que se trata de explicar mediante un mecanismo por el cual el Ca^{++} actúa desviando un inhibidor protéico[26], pero que sería opcionalmente interpretado como CA^{++}, permitiendo la activación de un activador proteíco de la FDE, cadena que pudiera ser activada independientemente por tripsina (lo que daría cierta coherencia a los datos hasta aquí enumerados). En relación con el efecto de Ca^{++}, la activación de la FDE por el imidazol y algunos análogos es bloqueada por EGTA[26]. La activación parece incompetitiva[32].

Magnesio o Manganeso son indispensables para la acción de la FDE[32] y los quelantes de Mg (ATP, ADP, EDTA, Pirofosfato) inhiben la enzima[36,37]. ATP y ADP tienen una acción inhibitoria paralela como derivados de la adenina. Por un mecanismo desconocido, el Zn^{++} es inhibidor de la FDE[38]. Como se verá más adelante, es fisiológicamente importante que la interacción de AMPc con las proteínocinasas protege a aquél de la hidrólisis por FDE[39].

Habiendo expuesto la amalgama de datos dis-

ponibles sobre las características del sistema enzimático del AMPc en el cerebro, resta aquí apuntar algo sobre el balance de la actividad del sistema: la concentración del AMPc en el cerebro de rata[40] alcanza en estado normal niveles altos en cerebelo, pineal y pituitaria (40 pmoles/mg de proteína), medianos en telencéfalo, bulbo olfatorio, diencéfalo y médula (20 pmoles/mg proteína), y bajos en tubérculos cuadrigéminos, núcleo caudado, hipocampo, puente y bulbo (10 pmoles/mg proteína). La distribución de concentraciones del AMPc en las diferentes regiones del cerebro corresponde con las zonas de mayor recambio de catecolaminas[41]. Este último dato nos introduce al siguiente punto a tocar:

Factores "hormonales" que modulan los niveles de AMPc

Theodore Rall, que colaboró con Sutherland en los primeros trabajos sobre AMPc, ha sido el único del grupo pionero que ha centrado su atención en los factores que regulan la síntesis de degradación del AMPc en el cerebro. Hoy, muchos investigadores se han interesado en el problema y han encontrado que los estímulos que causan depolarización de las neuronas, aumentan los niveles de AMPc en el tejido. Como resultado de la depolarización, las neuronas, o bien disparan, o disminuyen su umbral para estímulos subsecuentes. Los estímulos que se han estudiado incluyen los químicos (neurotransmisores, como norepinefrina (NE), 5-hidroxi-triptofano (5TH) e Histamina) y los eléctricos. Como es conocido, los neurotransmisores parecen unirse a receptores en la membrana celular y este hecho, a su vez, incrementa la actividad de la Adenilciclasa.

Estímulos eléctricos

La estimulación eléctrica, que puede producir la liberación de neurotransmisor a las hendiduras sinápticas, es posible que tenga también una acción indirecta sobre la AC, provocando la liberación de adenosina. Ésta, que no parece ser un neurotransmisor (se ha reportado que en las sinápsis "purinérgicas" del sistema nervioso simpático el ATP pudiera serlo[42]), produce gran incremento de la concentración de AMPc en rebanadas de cerebro[43,44]. Aunque la adenosina también aumenta el AMPc por ser su precursor (incluso de fuentes extracelulares[45]), este hecho sólo podría justificar una cuarta parte del aumento total observado[46]. Debe mencionarse que este efecto de la adenosina elevando el nivel de AMPc se ha estudiado también en placa neuromuscular (provoca una disminución de frecuencia en los potenciales miniatura[47]) y también en cultivos de glía, células que parecen ser responsables en parte de los aumentos de AMPc observados en cerebro[48].

De acuerdo con Rall, la adenosina estimula la AC uniéndose a un receptor específico en la membrana, que no es afectado por las neurohormonas y es relativamente independiente de la transmisión sináptica; el conocido inhibidor de la FDE, teofilina, cancela los aumentos en AMPc provocados por la estimulación eléctrica y/o adenosina, al parecer bloqueando el receptor de adenosina, y por otro lado, potencía el aumento de AMPc causado por neurotransmisores, inhibiendo la hidrólisis de aquél (se sabe que la teofilina no tiene efecto en la estimulación de la AC por floruro[49]). Debido a esta doble acción, el efecto neto de la teofilina sobre el nivel de AMPc depende totalmente de las características del dispositivo experimental y no puede ser fácilmente tomado como criterio para dilucidar el mecanismo que está operando. Las variables primordiales a considerar son: la integridad del dispositivo, la concentración de teofilina, los tiempos a que se buscan los efectos, la concentración de AMPc preexistente y la producida, y el método de ensayo (el efecto de inhibición de la AC sólo se observa cuando la poza de AMPc es tan grande que prácticamente no se destruye durante el ensayo, y entonces el efecto sobre la FDE es insignificante[49]). De la influencia del método de ensayo sobre el balance observado, conviene destacar que si las rebanadas de cerebro estudiadas se cortan a temperatura ambiente en vez de hacerlo en frío, el clásico efecto de la teofilina, elevando el AMPc en presencia o ausencia de neurotransmisor, por razones desconocidas, desaparece[50], y que la presencia de teofilina durante estimulación eléctrica inhibe el aumento esperado de AMPc en 2/3 partes[50]. Estos hechos, aunados a la evidencia de que cantidades de máxima efectividad de neurotransmisor son aditivas con los efectos del estímulo eléctrico, basan la hipótesis de que neurotransmisores y depolarización eléctrica actúan sobre los niveles de AMPc por mecanismos distintos. El que adenosina y pulsos eléctricos no tengan efectos aditivos[51], favorece la hipótesis de que el efecto de éstos sea mediado por la primera.

John W. Daly y colaboradores han observado

que agentes depolarizantes como ouabaina, veratridina, batracotoxina[52] y, al menos parcialmente, el potasio[53], aumentan la conversión de ATP a AMPc y causan de modo paralelo una liberación de adenosina en el tejido. Como este efecto de los depolarizantes es bloqueado por la teofilina, Daly ha postulado que su acción la ejercen a través de adenosina. Se podría pensar que la acción de los depolarizantes se debiera a una depolarización presináptica seguida de liberación de transmisor, pero existe evidencia de que el efecto en el nivel de AMPc aumenta con Mg, que bloquea la liberación de mediador, y también favorece los aumentos de AMPc provocados por incubación con norepinefrina e histamina[54], lo que indica una posible acción postsináptica. Además, la liberación de transmisor se bloquea en ausencia de Ca^{++}, y se ha observado que, tanto el efecto de depolarizantes y neurotransmisores exógenos como de adenosina, no depende del Ca^{++}[54].

Rall y Sattin observan que la adenosina interacciona sinérgicamente con las neurohormonas, para producir un aumento mucho mayor de AMPc que la suma de los provocados por cada estímulo separado [51]. Quizá esto pudiese modificar la actividad de las neuronas en el cerebro; pero, esta hipótesis necesita madurar con un mejor conocimiento del modo de acción del AMPc en tejido nervioso.

En este punto conviene tocar un tema de importancia relacionado con los mencionados efectos de la adenosina. A pesar de que, desde etapas tempranas, fue evidente que los niveles de AMPc en cerebro aumentaban a tiempos cortos después de la muerte[55,56,57], sólo recientemente se ha investigado un posible mecanismo que dé explicación al hecho. El shock electroconvulsivo[58] o el fluoretil[59] (curiosamente, agentes destructores de la llamada memoria de corto plazo) producen anoxia, al igual que la decapitación y, consecuentemente, defosforilación de nucleótidos, lo que produce algo de adenosina que se puede difundir al espacio extracelular y activar la AC por un receptor accesible desde ese punto. Estos datos justificarían el aumento de AMPc que se observa en las lesiones cerebrales y en la muerte[59] y quizás por agentes depolarizantes.

Modulación por neurotransmisores y fármacos

Aunque a la fecha se han realizado algunos trabajos sobre el efecto *in vivo* de los neurotransmisores[60] que corroboran de modo grueso los resultados *in vitro*, son estos últimos los que han provisto más información en el campo. Varios diseños experimentales usando homogenados de cerebro[61] no han podido demostrar una activación consistente de la adenil-ciclasa por norepinefrina (NE), histamina, serotonina o dopamina, aún a altas concentraciones —excepto por los efectos positivos de NE en homogenados de pineal[62]— muy probablemente debido a algún factor que dependa de la integridad de las membranas. En cambio, se ha demostrado[53] que se acumula AMPc en rebanadas de cerebro incubadas con NE o histamina. La potencia del neurotransmisor varía entre varias especies (siendo la histamina más activa en cerebro de conejo y la NE más activa en cerebro de rata) y también entre distintas regiones encefálicas (la NE es más potente que la histamina en cerebelo, pero no lo es en el resto del encéfalo de conejo y de rata[53,63,64,65]). Los estudios sobre la activación de AC en fracciones subcelulares están empezando y los resultados, aumentos por NE y dopamina, pero no por serotonina e histamina, son provisionales[66].

Los efectos de histamina y NE en el AMPc de rebanadas de cerebro no son significativamente atenuados, respectivamente, por bloqueadores adrenérgicos y antihistamínicos; pero, sí lo son por sus antagonistas correspondientes[54,67], lo que parece restar importancia a la posibilidad de efectos polisinápticos. La serotonina produce aumentos más discretos de AMPc, pero parece reducir la respuesta a NE[53]. La incubación con acetilcolina (ésta parece evocar aumentos en GMPc[68,69]), dopamina, glutamato y GABA no produce aumentos significativos de AMPc sobre los controles, tanto en cerebro como en cerebelo. En rebanadas de cerebro de cuy, las anfetaminas y la mezcalina parecen inactivas al respecto[70], y los tranquilizantes tricíclicos, como desipramina e imipramina, presentan actividad bloqueable por teofilina[70,71]. Esto parece indicar que, al menos parte de su efecto es a través de adenosina, como el de los agentes depolarizantes, cuyo efecto es bloqueado también por estabilizadores de membrana, anestésicos locales y tetrodotoxina[72]. Este efecto de los tranquilizantes tricíclicos, es improbable que se deba a su acción inhibidora de la FDE[73,74], ya que esta inhibición es marginal a las bajas concentraciones usadas[71] y, además, los inhibidores de la PDE (teofilina y cloropromazina, que es también un estabilizador de membrana), que casi no tienen efecto administrados solos[68], bloquean los aumentos de AMPc producidos

por esos tranquilizantes. Se ha reportado también que derivados de fenotiazina (trifluoperazina, cloropromazina) previenen el aumento de AMPc inducido por anoxia[75] y por NE[75,76], sin afectar el nivel basal de aquél.

El estudio de la modulación química del sistema del AMPc se ha realizado también en sistemas más sencillos, como en *Aplysia*, en la que la estimulación eléctrica o por neurotransmisores (serotonina y dopamina) aumenta los niveles de AMPc[77,78], y en sistemas más complicados como el cerebro humano, que responde en orden decreciente a NE, histamina y serotonina[79,80], por lo que se asemeja en este aspecto al cerebro de rata más que a los de cuy y conejo.

Funciones del AMPc en tejido nervioso

Habiendo revisado los mecanismos que controlan el nivel de AMP cíclico en tejido nervioso, es claro que la siguiente interrogante forzosamente se dirige al papel funcional que el AMPc pueda desempeñar allí donde se encuentra y, como se ha venido haciendo obvio en el curso de estas referencias, el sistema del segundo mensajero y por tanto, al menos en su mayor parte, él mismo, se encuentran fundamentalmente en el aparato sináptico y sus vecindades inmediatas. Sin embargo, no ha sido posible establecer con certeza si estas acciones fisiológicas del AMPc son presinápticas, postsinápticas u holosinápticas.

Acción presináptica

Son múltiples los hallazgos[81] que han llevado a investigar un papel presináptico de AMPc en la liberación de los neurotransmisores. Mucho de nuestro conocimiento de la transmisión sináptica se ha obtenido por estudios en la placa neuromuscular y se ha establecido que las catecolaminas facilitan esta transmisión, promoviendo la liberación de acetilcolina de la motoneurona[82,83]. Ya que el AMPc parece mediar muchos de los efectos fisiológicos de las catecolaminas, y las catecolaminas producen acumulación del AMPc en el cerebro[61,65,84,85], pudiera ser que los efectos facilitadores de las catecolaminas en la placa neuromuscular estuviesen mediados por AMPc[86,87].

Sobre esta hipótesis Breckenridge[86] encontró que la teofilina potencía el aumento de la tensión del gastrocnemio de gato, producido por epinefrina. Goldberg y Singer[88,89], en placa curarizada de diafragma registrando PPE (potencial postsináptico excitatorio) compuestos, encontraron que la teofilina y el dibutiril-AMPc (DB-AMPc análogo del AMPc) aumentan su amplitud, del mismo modo que la epinefrina. Aunque estos datos no distinguen entre facilitación en la liberación y aumento de la sensibilidad postsináptica, es evidente el efecto presináptico, por el hecho de que el registro intracelular muestra aumento en el número de potenciales miniatura y no modificación a su amplitud. Además, el contenido cuántico de los PPE (núm. de paquetes/PPE) aumenta con teofilina, DB-AMPc y epinefrina.

Ya que se sabe que muchos procesos de secreción hormonal y liberación de transmisores parecen compartir una serie de características[81] (requerimiento de calcio, inhibición por grandes cantidades de magnesio, estimulación por potasio, facilitación por ouabaína y depolarización membranal durante la secreción), se ha pensado que el efecto presináptico del AMPc podría atribuirse a una modificación producida en los niveles de Ca^{++}, que parece se requiere que "aumente" en la presinapsis, con antelación a la liberación del neurotransmisor[90]. La importancia del calcio en el acoplamiento excitación —secreción también sugiere una analogía con el proceso excitación— concentración en músculo[91], ya que en ambos procesos este catión acopla un evento eléctrico con un evento mecánico. Se sabe que substancias relacionadas con el sistema del AMPc modifican, tanto el movimiento del calcio, como la concentración muscular[92,93,94] y la liberación hormonal[84]. Aunque se ha experimentado en preparaciones de sinaptosomas[95], para intentar averiguar si de hecho el movimiento de Ca^{++} es modulable por AMPc, los resultados han sido contradictorios hasta ahora. Con todo, el hallazgo en cerebro, y en especial en los sinaptosomas, de proteínas membranales que unen calcio con alta afinidad[96,97], da material para futuras investigaciones sobre la relación Ca-AMPc en la liberación de neurotransmisores. Hasta ahora, el papel presináptico de AMPc no sólo no lo excluye de una función postsináptica, como se verá a continuación, sino que le da semejanza con ciertos sistemas hormonales (ACTH por ejemplo[84]) en que la liberación de la hormona y la acción de ésta en el blanco están ambas mediadas por AMPc.

Acción postsináptica

Los efectos postsinápticos del AMPc han sido estudiados más ampliamente que los presinápticos y parecen ser más numerosos que éstos. Conviene empezar históricamente y esquemati-

zar las características diferenciales en el cerebro, de la enzima que primero se relacionó con los efectos de AMPc: la proteína fosfocinasa (PFC). Desde 1968, el grupo de Paul Greengard, con base en los estudios de Krebs y colaboradores sobre el mecanismo a través del cual el AMPc regula la glucogenolisis en músculo esquelético, y los hallazgos de Kakiuchi y Rall[53] de que el AMPc no parece regular el matabolismo del glucógeno en cerebro, postuló que el receptor del AMPc (la PFC) en cerebro, pudiera tener un sustrato natural, con una función distinta a la que tiene en otros tejidos[98,99].

Las proteínocinasas en general, parecen constar al menos de 2 subunidades, una regulatoria y otra catalítica. La primera, al acoplarse con AMPc, se separa de la segunda, desinhibiéndola. La unidad catalítica activa es capaz de fosforilar ciertos tipos de proteínas, usando para ello ATP y liberando ADP. La enzima que encontraron tiene, como las otras PFC, gran especificidad para ser activada por AMPc, y su efecto no es favorecido ni antagonizado por otros nucleótidos: el AMPc disminuye, como era de esperarse, el Km de la enzima por ATP y aumenta la V máxima a altas concentraciones. Mg^{+2} es un catión indispensable para su actividad y en presencia de Ca^{+2} el AMPc inhibe sus propiedades catalíticas. Aunque se han usado proteínas básicas como substratos fosforilables por la enzima, recientemente se han reportado substratos protéicos intrínsecos mejores en membranas de cerebro de buey y de rata[100,101,102]. Ontogénicamente, la PFC de cerebro aumenta entre los 6 y los 20 días después del nacimiento[103], y su distribución subcelular la hace 60% particulada (35% de ella en fracción mitocondrial cruda y de ésta el 70% sinaptosomal[104,105]. Kuo y Greengard[98,99] han propuesto que los distintos efectos fisiológicos del AMPc en un mismo tejido sean mediados a través de varias proteínocinasas que tendrían distintos Ka por AMPc (esto no parece ser así, pues los Km hasta ahora encontrados[106] están todos en el orden de 10^{-8}M. y además, se han encontrado PFC dependientes de GMPc[107,108]), distintos substratos y éstos diferentes funciones.

Las acciones fisiológicas del AMPc en el sistema nervioso se han tratado de investigar bajo diferentes enfoques. Aquí las clasificaremos, artificialmente, en acciones directas sobre la transmisión sináptica, y en acciones metabólicas y morfogénicas generales.

Modificación de la transmisión sináptica por el AMPc

Floy E. Bloom y sus colegas G. Siggins y B. Hoffer, en su laboratorio del hospital St. Elizabeth, de Wáshington, DC, han concentrado sus esfuerzos en el estudio de la regulación de las frecuencias de disparo de las células de Purkinje de la corteza cerebelosa (la mayor parte de esta información ha sido tomada de una revisión publicada recientemente por ellos[109]). Los axones de estas células son los únicos eferentes de este órgano, y han encontrado que la aplicación iontoforética de norepinefrina a las células de Purkinje, altera de un modo especial su patrón característico de disparo: aumentando la proporción de pausas largas que separan frecuencias rápidas de disparo. Usando un microelectrodo intracelular se determinó que las células se hiperpolarizaban y, por ello, disminuían su excitabilidad. La hiperpolarización es causada generalemente por un aumento de conductancia membranal al K^+ (salida pasiva) y/o Cl^- (entrada pasiva) que provocan transmisores inhibitorios como el GABA; pero, la inhibición por NE parecía seguir un mecanismo distinto, ya que aumentaba la resistencia de la membrana[110]. En relación con esto, mientras el GABA reduce la amplitud del PPE producido por estímulo de las fibras trepadoras, el efecto contrario se encuentra en la inhibición producida por NE[110].

Con posterioridad a estas observaciones, Bloom identificó histoquímicamente axones con NE que se originaban en el *locus ceruleus* (esto se averiguó por degeneración con 6-hidroxidopamina) y hacen sinapsis con las células de Purkinje. La estimulación de estas células producía los efectos de la NE. Según Bloom, los efectos de la NE están mediados por el AMPc que ella genera, ya que éste replica sus efectos. Incluso los inhibidores de la FDE potencian los efectos de ambos NE y AMPc, y las prostaglandinas, que se sabe reducen las concentraciones de AMPc en otros tejidos, bloquean los efectos de NE en el cerebelo. Sin embargo, se ha reportado[111] que que AMPc no mimetiza a la NE. Estos resultados contradictorios pudieran deberse a factores de permeabilidad, ya que el DBAMPc, más lipófilo, ha demostrado tener mayor potencia para replicar los efectos de la NE que el AMPc. Bloom ha demostrado, por inmunofluorescencia, que el AMPc de las células de Purkinje aumenta por estimulación del *locus ceruleus* o por aplicación iontoforética de NE.

Actualmente, Bloom intenta correlacionar el comportamiento animal con los cambios en los

patrones de disparo de las células de Purkinje. Ha encontrado que las fibras noradrenérgicas del *locus ceruleus* disparan a bajas frecuencias, cuando el animal está en reposo o en sueño de ondas lentas; a frecuencias altas e irregulares, durante sueño paradójico; y con frecuencias regulares y rápidas, en vigilia atenta. Quizá estos hechos *per se* no produzcan los cambios de comportamiento, pero es posible que esos patrones sean usados según la respuesta necesaria del animal al medio. También intenta cultivar células de Purkinje maduras, para estudiar los efectos del AMPc en los sistemas enzimáticos y en la expresión genética de estas células.

Paul Greengard, durante sus ya mencionados estudios sobre las proteínocinasas, encontró que un componente protéico de la fracción de membranas sinápticas de cerebro de rata es fosforilado específicamente en presencia de AMPc. Estas membranas sinápticas contenían también proteínocinasa y fosfoproteína fosfatasa. Estos datos le llevaron al estudio del papel del AmPc en la transmisión sináptica, usando inicialmente una más simple y por ello más fácil de analizar: el ganglio cervical superior de conejo.

Este ganglio cervical superior (gcs) consta de 3 estructuras componentes: 1) las fibras aferentes preganglionares, originadas en la médula que liberan acetilcolina; 2) interneuronas que reciben entradas de fibras preganglionares y liberan dopamina a las neuronas postganglionares; 3) las neuronas postganglionares y fibras eferentes, que reciben información, tanto de las fibras preganglionares, como de las interneuronas. Greengard ha observado que la estimulación de las fibras preganglionares produce un aumento en los niveles de AMPc del ganglio, asociado con la transmisión sináptica y no con la conducción[112]. Este aumento es postsináptico, inhibible por atropina[112] y no se produce por estimulación postganglionar[113]. Posteriormente se determinó que era la dopamina de las interneuronas[113], y no la acetilcolina, la que producía este efecto (el gcs contiene dopamina y norepinefrina, esta última en las neuronas postganglionares[114]) ya que bloqueadores α (y no los β), inhiben los aumentos de AMPc por dopamina y estimulación presináptica[113].

Posteriormente se observó que el aumento de AMPc provoca una hiperpolarización en la neurona postganglionar (efecto que se reproduce con aplicación iontoforética de AMPc o dopamina) disminuyendo su excitabilidad[115]. La naturaleza de esta hiperpolarización es muy especial: normalmente la estimulación preganglionar produce un PPE inicial rápido, seguido por un PPI (potencial postsináptico inhibitorio) lento, con duración de 600 m seg y un PPE lento de 30 segundos. Greengard probó que el PPI lento es producido por dopamina o estimulación y que se potencía con teofilina e inhibe con Prostaglandina E_1 (PGE_1). Por otro lado, el PPE lento no se modifica con teofilina, aunque las prostaglandinas lo reducen[116]. Tanto el PPI lento como el PPE lento desaparecen con bloqueadores α y se potencian con inhibidores de la catecolometil transferasa (COMT)[117]. La acción muscarínica prolongada, estimulando las neuronas dopaminérgicas, puede depletarlas de transmisor y también suprime ambos postpotenciales lentos[117]. Aunque la dopamina parece tener también acción sobre el PPE lento, esta sería una modulación facilitadora presináptica, ya que ocurre aún sin potencial rápido postsináptico[117]. Con todo, la generación del PPE lento quizás esté más relacionada con produción de GMPc, ya que es una respuesta mediada muscarínicamente[116]. En sistema nervioso de invertebrados[118], el dibutiril AMPc parece producir solamente PPE lentos.

Aunque Greengard postula que es el AMPc el que produce la hiperpolarización lenta en las células postganglionares, debido a que el AMPc generado durante el estímulo activa una cinasa que fosforila proteínas de la membrana sináptica, no intenta explicar como una fosforilación podría modificar el potencial de esta membrana. La Dra. Clara Torda se ha interesado en este problema, tomando como modelo el ganglio torácico de cucaracha. En principio, observó que la acción del calcio en la respuesta postsináptica parece preceder a la participación del Na^{+} [119] (hecho confirmado por otros autores[120]) y que el aumento de la latencia de formación de espigas debida a pérdida de Ca^{+2}, se puede acortar con AMPc[119]. Posteriormente postuló que en la transmisión sináptica, el complejo receptor-transmisor activa inicialmente la trifosfoinositido fosfomonoesterasa (TFIME), hidrolizando trifosfoinositido a difosfoinositido. Al ser menor la afinidad del Ca^{+2} por este último, se liberaría calcio de la membrana y esto modificaría el transporte pasivo de Na^{+}, aunque existen datos de que, en el nervio, la inyección intracelular de Ca^{+2} hiperpolariza, aumentando la conductividad a K^{+} [121]. Ya en ese estado de polarización, el AMPc previamente formado por estímulos de la AC, a través de un mecanismo de proteína cinasa activaría la difosfoinositido cinasa (DFIC) que, regenerando el trifosfoino-

sitido, uniría Ca^{+} a membrana, cerrando el acceso al sodio. La DFIC activada, que es parte de la $Na^{+}K^{+}$-ATPasa, iniciaría el funcionamiento de la bomba de Na-K[122]. Sobre esta hipótesis, Torda comprobó que la inyección intracelular de DFIC activa o de DFIC inactiva junto con AMPc, producía la hiperpolarización esperada y era aditiva sólo con hiperpolarizaciones submáximas provocadas eléctricamente[123]. Existe además evidencia de que el AMPc puede de hecho modificar la eficiencia de un "captador de Ca^{+2}" en el cerebro[124]. Como es evidente, este mecanismo está todavía en los comienzos de su estudio experimental y no se puede concluir aún nada seguro.

Los efectos fisiológicos del AMPc generado en la transmisión sináptica no son bien entendidos todavía; sin embargo, Greengard ha especulado que la estimulación de AMPc sobre proteína cinasas pudiera resultar en cambios transitorios y/o persistentes —incluso en el establecimiento de memoria de corta y larga duración— en las propiedades de las neuronas. La fosforilación de proteínas membranales[101,102,125] daría cuenta de cambios a corto plazo, que desaparecerían por la acción de una fosfoproteína fosfatasa. Por otro lado, la fosforilación de histonas[126] estaría relacionada con efectos en la modulación del genoma y quizá cambios a largo plazo.

Greengard y colaboradores han extendido recientemente sus investigaciones al núcleo caudado de la rata, donde han encontrado una AC parecida a la del ganglio simpático. Las bajas concentraciones de dopamina (DA) allí existentes estimulan su actividad. El núcleo caudado forma parte de los sistemas de coordinación muscular y en enfermos de Parkinson los síntomas están asociados con una disminución de DA en este centro. Cloropromazina y haloperidol producen temblores y otros síntomas similares a los del Parkinson, porque antagonizan a la DA en este sitio. Es éste, por tanto, un tema sumamente atractivo como objeto de estudios más amplios.

Quedan numerosas preguntas por contestar respecto al papel de AMPc en la transmisión sináptica y las actuales teorías bien pudieran requerir una amplia modificación, pero el lugar adonde hemos llegado es tal que nos permite esperar con confianza una mejor comprensión de los eventos relacionados con la comunicación entre células nerviosas.

Algunos efectos metabólicos y morfogenéticos del AMPc en el sistema nervioso

Los efectos del AMPc no se producen por igual en todos los tejidos y una misma hormona o transmisor difiere en su efecto fisiológico sobre distintos tipos celulares. Esta peculiaridad se aprecia mejor cuando se da uno cuenta de que los mensajeros modifican las velocidades de ciertos procesos, pero no parecen dotar a la célula de propiedades que antes no tuviera, cuando menos en algún grado.

Aunque es posible que no todos los efectos de AMPc sean mediados por proteíno cinasas, la hipótesis relacionada con éstas es adecuada para empezar; recuérdese que el primer efecto conocido de AMPc, la glucogenólisis, es mediado por una fosfoproteína fosfocinasa; sin embargo, este efecto glucogenolítico de AMPc no ha podido ser observado en cerebro, aunque las enzimas relacionadas, fosforilasa cinasa y fosforilasa fosfatasa, están presentes en él[53]. La biosíntesis de glucógeno en el cerebro, por el contrario, sí parece estar regulada por los niveles de AMPc[127].

El AMPc no sólo puede regular actividades enzimáticas, sino inducir la síntesis de proteínas en ciertos tejidos, a distintos niveles. Es posible que promueva la transcripción, activando el montaje de la RNA polimerasa (en bacterias[128]) o fosforilando proteínas nucleares, en especial histonas (en distintos tejidos de mamífero[126,129,130]). También existen numerosos ejemplos de la acción de AMPc en distintos tejidos a nivel de traducción (fosforilando proteínas ribosomales, por ejemplo, aunque el efecto pudiera ser muy inespecífico en cuanto al tipo de proteína producida[131]). En el tejido nervioso se ha estudiado especialmente su papel en la síntesis de los sistemas enzimáticos que regulan la producción de neurotransmisores (por ejemplo, la inducción a nivel transcripción de glutamina sintetasa por AMPc[132]). Con todo, en este tipo de estudios se ha encontrado más frecuentemente que la acción del AMPc sobre la síntesis de neurotransmisores se realiza a nivel del transporte de sus precursores, a través de la membrana neuronal, por ejemplo, su estimulación de la síntesis de serotonina se debe a un transporte aumentado de triptofano[133,134]; asimismo, el aumento inducido por AMPc de NE se debe a una mayor disponibilidad de tirosina[135].

El AMPc también pudiera estar relacionado con otra clase de transporte, el axonal. Ya que se ha involucrado al AMPc en procesos secre-

torios, y el flujo axonal parece formar parte de éstos, se ha pensado en una relación causal AMPc-transporte axonal[136]*. Pensando en una secuencia AMPc neurotúbulos-transporte axonal se observó que una proteíno cinasa dependiente de AMPc puede fosforilar componentes de los microtúbulos[138], esto quizá esté relacionado con su ensamblaje, y que la colchicina, citocalasina B y vinblastina inhiben la liberación de NE y dopamina β hidroxilasa, que a su vez es aumentada por DB-AMPc[139] (queda por probar si esto último sucede a nivel de neurotúbulos y transporte o si está relacionado con el mecanismo mismo de liberación).

Otros grupos se han interesado en los efectos estimuladores de AMPc sobre la elongación axonal[140] y en procesos neurotróficos[141], ya que el AMPc es capaz de mantener la estructura de la placa neuromuscular y la actividad localizada de colinesterasa, que en el músculo denervado suelen perderse.

AMPc, neuronas y glía

Uno de los principales problemas en los estudios bioquímicos del cerebro consiste en la pluralidad de tipos celulares, que incluyen neuronas, células gliales y tejido conectivo propiamente dicho. Debido a la extrema dificultad para la separación de los anteriores, los investigadores no han podido determinar aún qué grupos celulares son responsables de los cambios observados en relación con el complejo de AMPc. En un intento de resolver esta cuestión, varios laboratorios han dirigido sus esfuerzos al estudio de células nerviosas en cultivo. Alfred G. Golman y Marshal Niremberg, han investigado (por ejemplo[142,143]) los efectos de neurohormonas y otras sustancias sobre cultivos de neuroblastoma y de células gliales por separado. Aunque el neuroblastoma es un tumor de células embrionarias, algunas líneas poseen muchas propiedades de neuronas diferenciadas que pueden ser acentudas con AMPc[144-147]. Los estudios en ese laboratorio indican que el neuroblastoma no aumenta su AMPc en respuesta a isoproterenol (análogo de NE), histamina o adenosina y sólo es sensible a PGE_1 [143]. Por otro lado, la NE produce aumentos considerables de AMPc en tumores gliales y en cultivos mixtos de cerebro fetal (en estos últimos los incrementos de AMPc parecen ser proporcionales a la fracción de células gliales en el cultivo). Esto pudiera indicar, a pesar de las limitaciones del modelo experimental, que mucho de lo encontrado sobre el complejo del AMPc en cerebro ocurra fundamentalmente en la glía. Sin embargo, muchos científicos consideran que las células de neuroblastoma, capaces de dividirse, pueden no ser representativas de neuronas normales y maduras. Además, el neuroblastoma responde, fisiológicamente, no a NE sino a Ach, una hormona que generalmente no aumenta el AMPc, de aquí que sea difícil extrapolar las observaciones hechas en estos cultivos a los complejos AMPc del cerebro viviente.

AMPc y conducta

El significado del complejo del AMPc en el SNC es todavía oscuro y los datos de la distribución de éste en el cerebro no parecen ayudar a esclarecerle, ya que cambios positivos y negativos de su concentración en regiones vecinas tienden a anularse y, aún suponiendo que se eliminase esta limitación, ignoramos el papel que cada neurotransmisor tiene en diferentes partes del cerebro y, por tanto, el significado de los cambios en concentración de AMPc que ellos producen. Sin embargo, es posible como primera aproximación inyectar estereotáxicamente AMPc o DB-AMPc en regiones distintas de cerebro y observar los cambios conductuales desencadenados[148]. La inyección de dosis altas en los ventrículos laterales, hipotálamo o formación reticular, produce catatonia, aumento en la actividad motora o convulsiones, pudiendo el mismo animal exhibir más de uno de los efectos en secuencia variable, aunque suelen aparecer en el orden mencionado y a veces con iteración. La inyección en la formación reticular produce con una mayor frecuencia catatonía[148]. El hipotálamo anterior responde al AMPc con signos de miedo o furia, hipertermia y efectos adrenérgicos; el posterior, con efectos colinérgicos. Su aplicación en el núcleo fastigial del cerebelo produce sueño de ondas lentas (el AMPc potencia también la acción hipnógena de NE e histamina[149]). Conviene apuntar que, si la latencia de respuesta es larga (10 a 30 minutos) la duración de la respuesta lo es aún mayor (varias horas) lo que indica que los cambios producidos son de largo plazo. Ninguno de los efectos se bloquea con reserpina o cloropromazina.

Se sabe que la estimulación de distintas regiones del hipotálamo produce hambre o ano-

* Existe evidencia del transporte axonal de AC y FDE[137]; la coexistencia de ambas en el botón presináptico, apoyaría la hipótesis que adjudica un papel al AMPc en este locus. Aunque parte de la AC es de localización intracelular y no axolémica, no se sabe que organelo del axón la transporte (se ha probado que no son mitocondrias).

rexia y lo mismo la inyección local de catecolaminas. Este efecto pudiera no ser directamente sináptico, ya que las catecolaminas, a través del AMPc, pudieran producir una discreta glucogenólisis (aunque, como hemos visto, parece no ser así) y como las frecuencias de disparo de ciertas neuronas locales dependen de la glucosa del medio, podrían actuar de este modo sobre el apetito. De hecho se ha probado experimentalmente que aquí el AMPc replica los efectos de la NE[150], y esto se asemeja a lo observado en la corteza cerebelosa.

El AMPc parece también implicado en fenómenos de adicción y tolerancia como los provocados por el alcohol, que aumenta a largo plazo la sensibilidad de la AC[151,153], y por la morfina, cuyos efectos crónicos (dependencia y tolerancia) potencia el AMPc[154]. Estos hallazgos parecen interesantes, ya que quizá la respuesta crónica a estas drogas pueda ser una modalidad de memoria.

El AMPc, en fin, también se ha relacionado, aunque de modo impreciso, con desórdenes afectivos[155], psicosis maniaco-depresivas[156-159], y con el comienzo de perturbaciones relacionadas con el sueño[160]; pero, la complejidad de estos fenómenos está por ahora fuera del alcance de las ciencias básicas del cerebro. A pesar de ello, es posible que en pocos años se avance el suficiente camino como para estar en capacidad de vislumbrar la meta.

Referencias

1. Rall T. W., Sutherland, E. W. y Berthet, J., *J. Biol. Chem.*, **224**: 463, 1957.
2. Robison, G. A., Butcher, R. W. y Sutherland, E. W., Cyclic AMP. *Acad. Press.* (N. Y. Lond.), 1971.
3. Sutherland, E. W., Rall, J. W. y Menon, T., *J. Biol. Chem.*, **237**: 1220, 1962.
4. Butcher, R. W. y Sutherland, E. W., *J. Biol Chem.*, **237**: 1244, 1962.
5. De Robertis, E., Arnaiz, G. R. D., Alberici, M., Butcher, R. W. y Sutherland, E. W., *J. Biol. Chem.*, **237**: 3487, 1967.
6. Weiss, B. y Costa, E., *Science*, **156**: 1750, 1967.
7. Weiss, B., *J. Neurochem.*, **18**: 469, 1971.
8. Hommes, F. A. y Beere, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **237**: 296, 1971.
9. Bourne, H. R. y Melmon, K. L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **178**: 1, 1971.
10. Chagas, C., Nesralla-Lobao, H. y Esquibel, M. A., *CR Acad. Sci. D* (Paris), **274**: 1705, 1972.
11. Chagas, C., Nesralla-Lobao, H. y Esquibel, M. A., *CR Acad. Sci. D* (Paris), **274**: 1822, 1972.
12. Perkins, J. P. y Moore, M. M., *J. Biol. Chem.*, **246**: 62, 1971.
13. Drummond, G., I., Severson, D. L. y Duncan, L., *J. Biol. Chem.*, **246**: 4166, 1971.
14. Johnson, R. A. y Sutherland, E. W., *Fed. Proc.*, **30**: A220, 1971.
15. Forn, J. y Valdecas, F. G., *Biochem. Pharmacol.*, **20**: 2773, 1971.
16. Sutherland, E. W., Rall, T. W. y Menon, T., *J. Biol. Chem.*, **237**: 1220, 1962.
17. Birnbaumer, L., Pohl, S. L. y Rodbell, M., *J. Biol. Chem.*, **244**: 3468, 1969.
18. Bradham, L. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **276**: (2) 434, 1972.
19. Kakiuchi, S. y Yamazaki, R., *Biochem. Biophys. Res. Comm*, **41**: 1104, 1970.
20: 2773, 1971.
244: 3477, 1969.
21. Bar, H. y Hechter, O., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **63**: 350, 1969.
22. Lefknowit, R. J., Roth, J. y Pasta, I., *Nature*, **228**: 864, 1970.
23. Rasmassen, H., *Science*, **170**: 404, 1970.
24. Gaballah, S. y Popoff, C., *Brain Res.*, **25**: 220, 1971.
25. Isaac, P. y Grahame-Smith, D. G., *Biochem. J.*, **126**: 14p., 1971.
26. Miki, N. y Yoshida, H., *Biochem. Biophys. Acta*, **268**: (1), 166, 1972.
27. Johnson, G. A., Boukma, S. J., Lath, R. A. y Mathews, J., *Fed. Proc.*, **31**: A513, 1972.
28. Florendo, N. F., Greengard, P. y Barrnett, R. J., *J. Hist. Cyto.*, **18**: 682, 1970.
29. Breckenridge, Mc. L. y Johnston R. E., *J. Hist. Cytochem.*, **17**: 505, 1969.
30. Thompson, W. y Appleman M., *Biochem.*, **10**: 311, 1971.
31. Kakiuchi, S., Yamazaki, R. y Teshima, Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **42**: 968, 1971.
32. Roberts, E. y Simonsen, D. G., *Brain Res.*, **24**: 91, 1970.
33. Beavo, J. A., Hardman, J. G. y Sutherland, E. W., *J. Biol. Chem.*, **246**: 3841, 1971.
34. Uzunov, P. y Weiss, B., *Fed. Proc.*, **31**: A514, 1972.
35. Cheung, W. R., *J. Biol. Chem.*, **246**: 2859, 1971.
36. Cheung, W. R., *Biochem.*, **6**: 1079, 1967.
37. Gulyassy, P. F., *Life Sci.*, P2 10: 451, 1971.
38. Yamamoto, M. y Massey, K. L., *Comp. Biochem. Physiol.*, **30**: 941, 1969.
39. Odea, R. F., Haddox, M. K. y Goldberg, N. D., *Fed. Proc.*, **30**: A219, 1971.
40. Ebadi, M. S., Weiss, B. y Costa, E., *Arch. Neurology*, **24**: 353, 1971.
41. Cramer, H., Paul, M. I., Silberge, S. y Forn, J., *J. Neurochem.*, **18**: 1605, 1971.
42. Burnstock, G., *Pharm. Rev.*, **24**: (3), 509, 1972.
43. Sattin, A. y Rall, E. W., *Mol. Pharm.*, **6**: 13, 1970.
44. Shimizu, H. y Daly, J. W., *Biochim. Biophys. Acta.*, **222**: 465, 1970.
45. Simizu, H., Tanaka, S. y Kodama, T., *J. Neurochem.*, **19**: (3), 687, 1972.
46. Shimizu, H. y Daly, J., *Biochim. Biophys. Acta.*, **222**: 465 1970.
47. Ginsborg, B. L. y Hirst, G. D. S., *Nature Biol.* (Lond.), **232**: 63, 1971.
48. Clark, R. y Perkins, *Fed. Proc.*, **31**: 513A, 1972.
49. Sheppard, H., *Nature*, **228**: 567, 1970.
50. Kakiuchi, S., Rall, T. W. y McIlisain, H., *J. Neurochem.*, **16**: 485, 1969.

51. SATTIN, A. y RALL, T. W., *Molec. Pharm.*, **6**: 13, 1970.
52. SHIMIZU, H., CREVELING, C. R. y DALY. J. W., *Molec. Pharm.*, **6**: 184, 1970.
53. KAKIUCHI, S. y RALL, T. W., *Molec. Pharmacol.*, **4**: 379, 1968.
54. RALL, T. W. y SATTIN, A., *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **3**: 113, 1970.
55. BRECKENRIDGE, B. M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **52**: 1580, 1965.
56. DITZION, B. R., *Pharmacology*, **3**: 25, 1970.
57. SCHMIDT, M. J., HOPKINS, J. T., SCHMIDT, D. E. y ROBINSON, G. A., *Brain. Res.*, **42**: (2), 465, 1972.
58. LUST, W., PASSONEAU, J. V. y GOLDBERG, N. D., *Fed. Proc.*, **31**: 555A., 1972.
59. SATTIN, A., *J. Neurochem.*, **18**: 1087, 1971.
60. CHOU, W. S., HO, A. K. S. y HOH, H. H., *Nature Biol.* (Lond.), **233**: 280, 1971.
61. KLAINER, L. M., CHI. Y. M., FREIDBERG S. L., RALL, T. W. y SUTHERLAND, E. W., *J. Biol. Chem.*, **237**: 1239, 1962.
62. WEISS, B. y COSTA, E., *J. Phar. Exp. Ther.*, **161**: 310, 1968.
63. KRISHNA, G., FORN, J., VOIGT, K., PAUL, M. y GESSA, G. L., *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **3**: 155, 1970.
64. SHIMIZU, H., CREVELING, C. R. y DALY, J. W., *Adv. Bioch. Psychoph.*, **3**: 135, 1970.
65. KAKIUCHI, S. y RALL, T. W., *Molec. Pharmacol.*, **4**: 367, 1968.
66. HUNGEN, K. V. y ROBERTS, S., *Fed. Proc.*, **30**: 1205, 1971.
67. CHASIN, M. RIVKIN, I., MAVAK, F., SAMANIEGO, S. G. y HESS, S. M., *J. Biol. Chem.*, **246**: 3037, 1971.
68. FERRENDELLI, J. A., KINSCHERF, D. A. y KIPNIS, D. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **46**: (6) 2114, 1972.
69. KUO, J. F., LEE, T. P., REYES, P. L., WALTON, R. G., DONELLY, T. E. y GREENGARD, P., *J. Biol. Chem.*, **247**: 16, 1972.
70. HUANG, M. y DALY, J. W., *J. Med. Chem.*, **15**: (5), 458, 1972.
71. KODAMA, T., MATZUKADO, G., SUZUKI, T., TANAKA, S. y SHIMISU, H., *Biochem. Biophys. Acta*, **252**: 165, 1971.
72. HUANG, M., SHIMIZU, H. y DALY, J. W., *J. Med. Chem.*, **15**: (5), 462, 1972.
73. ABDULLA y HAMADAH, *The Lancet.*, Feb. 21, p. 378, 1970.
74. MUSCHEK, L. D. y MCNEILL, J. H., *Fed. Proc.*, **30**: A330, 1971.
75. UZUNOV, P. y WEISS, B., *Fed. Proc.*, **30**: A330, 1971.
76. PALMER, G. C., ROBISON, G. A. y SULSER, F., *Bioch. Pharm.*, **20**: 236, 1971.
77. CEDAR, H. y SCHWARTZ, J. H., *J. Gen. Physiol.*, **60**: (5), 570, 1972.
78. CEDAR, H., KANDEL, E. R. y SCHWARTZ, J. H., *J. Gen. Physiol.*, **60**: (5), 558, 1972.
79. SHIMIZA, H., TANAKA, S., SUZUKI, T. y MATZUKADO, Y., *J. Neurochem.*, **18**: 1157, 1971.
80. FUMAGALLI, R., BERNAREY., V., BERTI, F. y TRABUCCH, M., *Life Sci.*, (pl) **10**: 1111, 1971.
81. SINGER, J. J. y GOLDBERG, A., *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **3**: 335, 1970.
82. K. KRNJEVIC y R. MILEDI, *J. Physiol.*, **141**: 291, 1958.
83. JENKUNSION, D. H., STAMENOVIC, B. A. y WHITAKER, B. D. L., *J. Physiol.*, **195**: 743, 1968.
84. ROBISON, G. A., BUTCHER, R. W. y SUTHERLAND, E. W., *Ann. Rev. Bioch.*, **37**: 149, 1968.
85. KAKIUCHI, S. y RALL, T. W., *Molecular Pharmacol.*, **4**: 379, 1968.
86. BRECKENRIDGE, B. M., BURN, J. H. y MATSHIENSKY, F. M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **57**: 1893, 1967.
87. RASMUSSEN, H., y TENENHOUSE, A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **59**: 1364, 1968.
88. GOLDBERG, A. L. y SINGER, J. J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **64**: 134, 1969.
89. GOLDBERG, A. L., SINGER, J. J. y HENNEMAN, E., *Fed. Proc.*, **28**: 457, 1969.
90. KATZ, B. y MILEDI, R., *J. Physiol.*, **189**: 535, 1967.
91. DOUGLAS, W. W., *British J. Pharmacol.*, **34**: 451, 1968.
92. SKETON, C. L., LEVEY, G. S. y EPSTEIN, S. E., *Circulation Research*, **26**: 35, 1970.
93. SHINBOURNE, E. A., HESS, R. J., WHITE, M. L. y HAMER, J., *Cardiovascular Research*, **3**: 113, 1969.
94. GILLIBRAND, I. M. y MIALL, P. A., *Biochem. J.*, **128**: (3), 109 p, 1972.
95 DIAMOND, I. y GOLDBERG, A. L., *J. Neurochem.*, **18**: 1419, 1971.
96. WOLFF, D. J. y SIEGEL, F. L., *J. Biol. Chem.*, **247**: (13), 4180, 1972.
97. WOLFF, D. J. HUEBNER, J. A. y SIEGEL, F. L., *J. Neurochem.*, **19**: (12), 2855, 1972.
98. MIYAMOTO, E., KUO, J. F. y GREENGARD, P., *Science*, **165**: 63, 1969.
99. MIYAMOTO, E., KUO, J. F. y GREENGARD, P., *J. Biol. Chem.*, **244**: 6295, 1969.
100. WELLER, M. y RODNIGHT, *R., Nature*, **225**: 187, 1970.
101. JHONSON, E. M., UEDA, T., MAENO, H. y GREENGARD, P., *J. Biol. Chem.*, **247**: 5650, 1972.
102. JHONSON, E. M., MAENO, H. y GREENGARD, P., *J. Biol. Chem.*, **246**: 7731, 1971.
103. GABALLAH, S., POPOFF, C. y SOOKNAND, G., *Brain Res.*, **31**: 229, 1971.
104. GABALLAH, S. y POPOFF, C., *J. Neurochem.*, **18**: 1795, 1971.
105. MAENO, H., JHONSON, E. M. y GREENGARD, P., *J. Biol. Chem.*, **246**: 134, 1971.
106. KUO, J. F., KRUEGER, B. K., SANES, J. R. y GREENGARD, P., *Biochim. Biophys. Acta.*, **212**: 79, 1970.
107. KUO, J. F. y GREENGARD, P., *J. Biol. Chem.*, **245**: 2493, 1970.
108. HOFFMANN, F. y SOLD, G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **49**: 1100, 1972.
109. HOFFER, B. J., SIGGENS, G. R. y BLOOM, F. E., *Adv. Biochem. Psych. Pharm.*, **3**: 349, 1970.
110. SIGGINS, G. R., OLIVER, A. P., HOFFER, B. J. y BLOOM, F. E., *Science*, **171**: 192, 1971.
111. GODFRAIND, J. M. y PUMAIN, R., *Science*, **174**: 1258, 1971.
112. MCAFEE, D. A., SCHORDER, M. y GREENGARD, P., *Science*, **171**: 1156, 1971.
113. KEBABIAN, J. W. y GREENGARD, *P., Science*, **174**: 1346, 1971.
114. LIBET, B. y CTOSAKA, T., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **67**: 667, 1970.

115. McAfee, D. A. y Greengard, P., *Fed. Proc.*, **31**: A269, 1972.
116. McAfee, D. A. y Greengard, P., *Science*, **178**: 310, 1972.
117. Libet, B. y Tosaka, T., *Fed. Proc.*, **30**: 323A, 1971.
118. Auerbach, A. A. y Purpura, D. P., *Fed. Proc.*, **31**: A403, 1972.
119. Torda, C. y Sittler, O. D., *Fed. Proc.*, **30**: A665, 1971.
120. Rayner, M. D., *Fed. Proc.*, **31**: 403A, 1972.
121. Meech, R. W., *Comp. Biochem. Physiol.*, **42A**: 493, 1972.
122. Torda, C., *Fed. Proc.*, **31**: A33, 1972.
123. Rasmussen, H. y Tenenhouse, S., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **59**: 1364, 1968.
124. Torda, C., *Experientia*, **28**: (12) 1438, 1972.
125. Alemán, V., Bayón, A. y Molina, J., en "Neurohumoral Coding of Brain Function" (Ed. Myers y Dracker), Plenum Press N. Y., 1973.
126. Langan, T. A., *Adv. Bioch. Pharm. Psych.*, **3**: 307, 1970.
127. Goldberg, N. D., Lust, W. D., O'Dea, R. F., Wei, S. y O'Toole, A. G., *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **3**: 67, 1970.
128. Nissley, P., Anderson, W. B., Gallo, M., Perlman, R. L. y Pastan, I., *J. Biol. Chem.*, **247**: 4254, 1972.
129. Langan, T. A., *Fed. Proc.*, **30**: 1089, 1971.
130. Cross, M. L. y Ord, M. G., *Biochem, J.*, **120**: P21, 1970.
131. Walton, G. M., Gill, G. N., Abrass, I. B. y Garren, L. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **68**: 880, 1971.
132. Chader, G. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**: 1102, 1971.
133. Forn, J., Tagliamonte, A., Tagliamonte, P. y Gessa, G. L., *Nature* (*New Biol.*), **237**: 245-47, 1971.
134. Tagliamonte, A., Tagliamonte, P., Forn, J., Perez-cruz, J., Krishna, G. y Gessa, G. L., *J. Neurochem.*, **18**: 1191, 1971.
135. Keen, P. y McLean, W. G., *Brit. J. Pharmacol.*, **46**: 529, 1972.
136. Breckenridge, B. L. y Bray, J. J., *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **3**: 325, 1970.
137. Bray, J. J., Kon, C. M. y Breckenridge, B. M., *Brain Res.*, **26**: 385, 1971.
138. Murray, A. W. y Froscio, M., *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **44**: 1089, 1971.
139. Thoa, N. B., Wooten, G. F. y Axelrod, J., *Fed. Proc.*, **31**: A566, 1972.
140. Roisen, F. J., Murphy, R. A., Pichiche, M. E. y Branden, W. G., *Science*, **175**: 74, 1972.
141. Lentz, T. L., *Nature (New Biol)*, **238**: 154, 1972.
142. Gilman, A. G. y Niremberg, M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**: 2165, 1971.
143. Gilman, A. G. y Niremberg, M., *Nature*, **232**: 356, 1971.
144. Prasad, K. N., y Hsie, A. W., *Nature (New Biol)*, **233**: 141, 1971.
145. Prasad, Mandal B., Waymire, J. C., Lees, G. J., Vernadakis, A. y Weiner, N., *Nature (New Biol)*, **241**: 117, 1973.
146. Kirland, W. L. y Burton, P. R., *Nature (New Biol)*, **240**: 205, 1972.
147. Richelson, E., *Nature (New Biol)*, **242**: 175, 1973.
148. Gessa, G. L., Krishna, G., Forn, J., Tagliamonte, A. y Brodie, B. B., *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **3**: 371, 1970.
149. Delbarre, B., *J. Physiol.* (Paris), **63**: A38, 1971.
150. Booth, D. A., *Nature (New Biol)*, **237**: 222, 1972.
151. Omenn, G. S. y Motulsky, A. G., *Ann N. Y. Acad. Sci.*, **197**: 16, 1972.
152. Israel, M. A., Kimura, H. y Kuriyama, K., *Experientia*, **28**: 1322, 1972.
153. Gorman, R. E. y Bitensky, M. W., *Endocrinol*, **87**: 1075, 1970.
154. Ho, I. K., Loh, H. H. y Way, E. L., *Nature*, **238**: 397, 1972.
155. Robison, G. A., Coppen, A. J. Whybrow, P. C. y Prange, A. J. *Lancet*, **2**: 1028, 1970.
156. Paul, M. I., Cramer, H. y Bunney, W. E., *Science*, **171**: 300, 1971.
157. Pitts, F. N., *Behavioral Sci.*, **16**: 82, 1971.
158. Paul, M. I., Cramer, H. y Goodwin, F. K., *Arch. Gen Psychiat.*, **24**: 327, 1971.
159. Beer, B., *Science*, **176**: 428, 1972.
160. Bunney, W. E., Goodwin, F. K., Murphy, D. L., House, K. M. y Gordon, E. K., *Arch. Gen. Psychiat.*, **27**: 304, 1972.

Noticias

SEMBLANZA DEL DR. CARLOS CASAS CAMPILLO PREMIO NACIONAL DE CIENCIAS 1973 (MEXICO)

En el mundo científico de México a nadie ha sorprendido la noticia de la concesión del Premio Nacional de Ciencias a Carlos Casas Campillo, y menos aún a quiénes hemos seguido de cerca su labor tesonera e infatigable en favor, no sólo de la especialidad que cultiva, sino del desarrollo científico mexicano y de la formación de investigadores con sólidas bases académicas. A esta labor ha contribuido, tanto en el austero ambiente de su laboratorio, que sirvió de semillero en la formación de los primeros microbiólogos agrícolas e industriales con que contó el país, como participando en la cátedra, en la organización de sociedades científicas y en la planeación de la investigación del país a niveles tanto gubernamentales como privados.

Con pocas carreras tan fructíferas como la suya contamos y difícil sería emular una actividad que se ha proyectado en todas direcciones y todo ello en un marco de seriedad, de honestidad, de austeridad, diríamos, puesto que quiénes lo conocimos desde su época de estudiante no hemos dejado de admirar la entrega total de Casas a su labor científica, que se manifestó desde sus primeros años de estudiante y que hacía en ocasiones contraste con la alegre despreocupación de muchos de los que le rodeábamos. Su recta conducta y su honestidad acababan siempre por conquistar un sitio en el ambiente en el que actuaba y era en todas las ocasiones el señalado para ocupar un puesto directivo, ya fuera en una representación estudiantil, en una agrupación de egresados o en una sociedad científica, puesto que siempre se podía confiar en su rectitud y en su empeño en el cumplimiento de la responsabilidad que había aceptado.

La Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional de México constituyó un ambiente propicio para su desarrollo y sus aulas alentaron sus inquietudes científicas. La brillante carrera que se adivinaba en el estudiante serio, aunque apasionadamente entregado a sus estudios, se vio confirmada al transformarse después en un excelente profesor, que llega a ser con el tiempo Director de la institución y organizador de sus cursos de graduados. La cátedra, sin embargo, no fue su única labor dentro de sus actividades académicas, ya que éstas se continuaban en el laboratorio de investigación, donde, bajo su escrupulosa dirección, se formaron investigadores de valía, quiénes, ya en el campo de la Microbiología Básica o la Fisiología Microbiana o en el de las ciencias aplicativas, siempre destacaron como científicos de sólida formación, que en mucho se había debido a la disciplina que Casas adoptó en su laboratorio y que se reflejaba, tanto en lo riguroso de su metodología científica, como en la dedicación que exigía a quiénes solicitaban su tutela. No fue raro observar en aquel tiempo que un estudiante, con un mediocre desarrollo durante sus cinco años de estudios profesionales, hubiera adquirido en ese ambiente el interés que le permitió convertirse en un investigador destacado. Los que llegaron a sus manos con los méritos de un buen estudiante también eran estimulados y alentados, hasta hacer de ellos científicos, que no sólo contaran con un bagaje teórico, sino con una capacidad técnica y un criterio suficientes para resolver problemas científicos complejos, características que en sí definen a un buen investigador.

Cualidad muy loable de Carlos Casas Campillo, y que bien puede servir de ejemplo a los jóvenes científicos de nuestro país, frecuentemente tentados a seguir rutas de un falso y aristocratizante academismo, es su interés por resolver

problemas que pudieran contribuir en forma inmediata al desarrollo económico de México. Desde su iniciación como investigador ya se preocupó por mejorar la fertilidad de nuestros depauperados suelos, labor que le hace abandonar temporalmente los laboratorios de investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para iniciar una línea de trabajo semejante en la Dirección General de Defensa Agrícola de la Secretaría de Agricultura y Ganadería, donde realizó una actividad digna de un pionero. Siguiendo después consciente o inconscientemente el camino de su maestro en estudios de post-grado, el distinguido Profesor Waksman, en quién logró despertar una gran estimación, pasó de la Microbiología Agrícola a la Microbiología Industrial, en donde ha tenido, como es habitual en él, una actuación relevante. Su actividad en el distinguido grupo de investigadores que en un tiempo reunieron los Laboratorios Syntex, le convirtió en una personalidad destacada en el campo de las transformaciones microbianas de los esteroides que, al mismo tiempo que daba a Syntex numerosas patentes, proporcionaba a Casas renombre internacional. Como un incidente anecdótico, yo recuerdo en alguna de las Reuniones anuales de la Asociación Americana para la Microbiología, a la que asistimos juntos en la Ciudad de Houston, cómo asediaban a Casas algunos miembros de esa red de espionaje industrial que menudea en las reuniones de ciencias aplicadas, intentando obtener de él algunos informes útiles sobre procesos industriales microbianos. Aquí vale la pena recordar que su prestigio le hizo merecedor al reconocimiento de una de las primeras reuniones internacionales de Microbiología Aplicada, en donde fue nombrado Vicepresidente, y actualmente ocupa el mismo cargo en el Comité de Microbiología Económica y Aplicada de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología, así como el de Asesor de la UNESCO en un campo similar.

Es imposible dejar de mencionar la participación de Carlos Casas en la Organización de Sociedades Científicas, que han dado oportunidad a los profesionales mexicanos de exponer el fruto de sus esfuerzos o intercambiar experiencias entre sí y con personalidades científicas de otros países. En esta actividad resalta su participación en la fundación de la Asociación Mexicana de Microbiología y su colaboración permanente, que ha logrado, en unión de un pequeño grupo de entusiastas microbiólogos, ser el cimiento de la posteriormente creada Asociación Latinoamericana de Microbiología y la organizadora del único Congreso Internacional de Microbiología efectuado en un país de habla hispana. No fue ésta una labor que exclusivamente pueda acreditarse a Casas, pero él fue uno de los que colaboraron con fervoroso entusiasmo, como es evidente si se considera que fue el segundo presidente de la Asociación Mexicana de Microbiología y el presidente del Comité Organizador del mencionado X Congreso Internacional. Es de señalarse su actuación en estas actividades porque, siendo un miembro destacado de sociedades internacionales de tanto prestigio como la Academia Americana de Microbiología, la Academia de Ciencias de Nueva York, de la Asociación Americana para el Avance de las Ciencias o Miembro de Honor de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, no desdeña sus obligaciones como mexicano y ofrece siempre su concurso cuando se trata de promover la organización de sociedades nacionales o de dar directivas para el mejor aprovechamiento de nuestros pobres recursos destinados a la investigación; tal es el caso de su participación en el antiguo Instituto Nacional de la Investigación Científica o el actual Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como, en el ámbito latinoamericano, en los programas microbiológicos regionales de la OEA o de la Academia Americana de Microbiología.

Al escribir esta nota, no pretendíamos más que mostrar nuestro regocijo al enterarnos de que fue concedido un premio merecido a un compañero nuestro y no fue la intención hacer un panegírico, aunque quizás a ésto nos ha llevado la descripción de sus méritos, que no son en este caso los juegos de artificio que muy frecuentemente cortejan a falsas glorias nacionales, sino el producto de una labor tenaz, callada, pero ejemplar de que el seguir rutas como las que él ha trazado es el único camino que nos puede llevar a un verdadero progreso científico de nuestra patria.—ADOLFO PÉREZ MIRAVETE

LA FUNDACION EUGENIO RODRIGUEZ PASCUAL OTORGA AL DOCTOR FRANCISCO GRANDE COVIAN EL PREMIO 1972

El Patronato de la Fundación E. Rodríguez Pascual, constituida por un grupo selecto de personalidades científicas y de relevancia social, acordó por unanimidad otorgar el Premio 1972 a nuestro admirado amigo y compañero Francisco Grande.

El premio, importante por su cuantía, dos millones de pesetas, adquiere en esta ocasión significación más elevada por la calidad de la persona que lo recibe, y que, al aceptarlo, confiere a la Fundación un halo de prestigio, del prestigio auténtico de este hombre sabio, de raigambre española y renombre internacional.

El Profesor Grande es uno de los pilares más firmes del equipo de investigadores que, bajo los auspicios de Ancel Keys, trabajan desde hace varias décadas en el Laboratorio de Higiene Fisiológica de la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Minnesota, uno de los centros de investigación más activos de E.U.A.

La concesión del premio, con gala de buen juicio, fue vinculada, por los patronos, a la vida científica en conjunto del Dr. Grande. Parece que alguno de los componentes del patronato siguió, muy de cerca, la carrera de Grande desde las investigaciones iniciales en el laboratorio de Fisiología de la Residencia de Estudiantes de Madrid y las realizadas, a su regreso de Alemania, en el Instituto Nacional de la Alimentación, especialmente en las difíciles circunstancias que se produjeron por el asedio a la capital de las tropas fascistas. Después tuvo que aceptar trabajos eventuales que le permitieran subsistir en el ambiente hostil, enrarecido, que produjo la guerra. Ganó las oposiciones a la cátedra de Fisiología de Zaragoza y debió ser promovido a la de Madrid, si hubieran tomado en cuenta las prodigiosas condiciones y el talento de este candidato indiscutible.

Las inquietudes científicas de Grande, su extraordinaria preparación, su buen nombre, le depararon ambiente más aireado y propicio en Minneapolis, donde fue recibido con todos los honores y pudo trabajar a gusto en cordial colaboración con sus amigos y colaboradores. Sus investigaciones sobre metabolismo de los lípidos, especialmente de los esteroles, son de tal solidez que han conquistado el asenso general. La composición corporal del organismo y los factores que la determinan han contribuido a establecer nociones y conocimientos de extraordinaria validez científica.

No vamos a seguir, por ahora, el camino de una reseña biográfica de este insigne fisiólogo. Deseamos hacer algunos comentarios y mostrar únicamente nuestra satisfacción por el lauro que le han concedido. Esperamos que reciba otros galardones, ya que el profesor Grande se encuentra en la plenitud de su capacidad creadora.

La fundación E. Rodríguez Pascual facilita recursos para sufragar investigaciones en marcha, becas, subsidios y ayudas para alentar de manera efectiva vocaciones que otrora recibieran poca o ninguna atención en España. También se propone el Patronato auspiciar el intercambio cultural con otros países, invitando a investigadores para que ocupen en distintas universidades españolas la cátedra de sus especialidades.

Consideramos, estos propósitos, buen camino para recuperar las jornadas perdidas y asegurar un mejor porvenir a la Patria española.— J. PUCHE.

EL PATRONATO DE CIENCIA

AGRADECE LA AYUDA ECONÓMICA PRESTADA

POR EL

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

LA

COMPAÑIA FUNDIDORA DE FIERRO Y ACERO DE

MONTERREY, S. A.

Y EL

BANCO DE MEXICO, S. A.

CIENCIA
Revista hispano-americana de
Ciencias puras y aplicadas

Instrucciones a los autores

Esta revista sólo publicará trabajos originales e inéditos.

El Consejo Editorial se reserva el derecho de aceptar o rechazar los trabajos recibidos. Los originales sólo se devolverán a petición expresa del autor.

La Revita aceptará trabajos escritos en español, portugués, francés, inglés, italiano y alemán.

Conforme a las recomendaciones de la *UNESCO*, el *Consejo Internacional de Uniones Científicas, la Federación Internacional de Documentación*, etc., (*UNESCO/NS/177, 1962*), los trabajos se clasificarán en las siguientes categorías principales, con algunas subdivisiones ya conocidas de nuestra publicación:

a) *Memorias científicas originales.*

b) *Notas preliminares o publicaciones provisionales.*

c) *Estudios recapitulativos o revisiones.*

Especialmente para los trabajos que, a juicio de los autores, correspondan a una de las dos primeras (*a* o *b*), se les recomienda ajustarse tan estrictamente como les sea posible a las instrucciones que siguen.

Redacción del texto

Título

Deberá ser tan corto como sea posible, escrito totalmente en mayúsculas y no incluirá abreviaturas. El autor debe agregar su traducción al inglés (o al español, si está redactado en aquel idioma) y señalará en ambos casos las palabras clave del trabajo que permitan identificar su naturaleza y contenido y faciliten la elaboración del índice de materias.

Nombres del o de los autores

A continuación del título y en líneas bien separadas de aquel, se escribirán (también totalmente con mayúsculas) en la forma que acostumbren hacerlo para sus publicaciones, marcando claramente con tinta los acentos, tildes o guiones propios de su correcta ortografía. Seguidamente y aparte, se indicará la institución en que se hizo el trabajo y la dirección de la misma.

Resúmenes

Presentados en hoja por separado, serán redactados por el autor dos resúmenes, cuidando de que cada uno no tenga una extensión mayor de 200 palabras: el 1o., en el mismo idioma utilizado en el texto, y el 2o., en inglés. Si el trabajo está escrito en esta última lengua, deberá adjuntarse su traducción al español.

Introducción

Asentará con claridad los objetivos del trabajo y sus relaciones con otros anteriormente publicados sobre el mismo tema, evitando revisiones bibliográficas extensas.

Material y métodos

Se indicarán los materiales empleados y los métodos seguidos; cuando éstos sean nuevos o poco usuales, se describirán detalladamente, y los demás con brevedad o, mejor aún, señalando tan sólo la referencia bibliográfica correspondiente.

Resultados

Comprenderán exclusivamente los obtenidos en el trabajo que se publica, evitando en lo posible interpretaciones o discusiones personales. Su exposición mediante gráficas, tablas e ilustraciones, es preferible en muchos casos, siempre que se tienda a no incurrir en duplicidades inútiles.

Discusión

Se limitará exclusivamente a los resultados obtenidos en el trabajo, su significación y la relación que tengan con los publicados por otros autores, evitando hipótesis que no estén basadas en los datos presentados por el autor.

Referencias bibliográficas

Por ser ésta una revista multidisciplinaria no pueden establecerse normas específicas para la presentación de la bibliografía. Cada autor deberá apegarse a las reglas establecidas para su especialidad por alguna de las publicaciones periódicas internacionales de reconocido prestigio.

Presentación del manuscrito

El trabajo se presentará mecanografiado con tipo estándar, a doble espacio y dejando márgenes de 4 y 3 cm, en hojas tamaño carta de papel blanco apropiado para poder corregir con tinta. Se evitará el cortar palabras en el margen derecho o igualar con guiones innecesarios.

No deberá exceder de 15 cuartillas, salvo casos excepcionales que se discutirán con el editor, y todas irán numeradas progresivamente. Si es necesario hacer alguna pequeña corrección en el manuscrito, ésta se escribirá con tinta, suficientemente clara y en letra de molde.

Los resúmenes, tablas y cuadros deberán presentarse cada uno en una hoja por separado. Las tablas se numerarán con caracteres romanos, en serie independiente de la de las figuras (si las hay), debiendo llevar cada una su leyenda o título explicativo, lo mismo que los cuadros.

Es indispensable enviar el *original* del trabajo mecanografiado y una *copia* del mismo.

Ilustraciones

Las gráficas y dibujos —siempre *originales,* no reproducciones fotográficas— deberán trazarse con tinta china negra sobre papel blanco, de preferencia de tipo "albanene", y de un tamaño doble o triple del que se desea que aparezcan en la Revista. No debe utilizarse papel pautado comercial: cuadriculado, milimétrico, semilogarítmico, etc.

Las fotografías serán copias en blanco y negro, hechas en papel brillante y bien contrastadas.

Como una guía para preparar los originales con un tamaño conveniente, debe tenerse en cuenta lo que sigue: las dimensiones máximas con que puede aparecer impresa una ilustración en la Revista (plana completa) son de 23.5 × 15.5 cm; en estas medidas queda incluido el espacio que ocupará el título y el pie o explicación de la figura, así como la clave de símbolos o signos convencionales en el caso de mapas, gráficas, etc.; la anchura de una sola columna es de 7.5 cm.

Todas las ilustraciones, a las que conjuntamente se hará referencia en el texto como "figuras" (dibujos, gráficas, fotografías) se ordenarán progresivamente con números arábigos. Las escalas, números y letras correspondientes a cada una deben dibujarse sobre la propia figura, calculando bien su tamaño para que conserven su nitidez en los grabados.

La totalidad de las explicaciones o pies de las figuras, con su número correspondiente, deben escribirse a máquina, reunidas en una o más hojas agregadas al final del original del manuscrito.

Pruebas tipográficas

Si lo solicitan expresamente, los autores que lo deseen pueden recibir pruebas de galera o de planas para su revisión, siempre que ello no signifique un retraso considerable en la publicación.

Sobretiros

Una vez que el Consejo Editorial haya comunicado por escrito al autor la aceptación de su trabajo, el interesado deberá solicitar el número de sobretiros que desee. Una tabla referente a su costo acompañará a la notificación del Editor.

Los manuscritos (original y copia del trabajo) con sus ilustraciones y resúmenes, así como toda la correspondencia, deberán enviarse a

CIENCIA, MEX.

Apartado Postal 32133

México 1, D. F.

CIENCIA

Revista Hispano-americana de Ciencias puras y aplicadas

Suscripción anual 100.00 m/n ($ 10.00 US Cy.).

La colección completa, formada por los veintisiete volúmenes I (1940) a XXVII (1972), vale $ 5 000.00 m/n ($ 500.00 US Cy.).

De los volúmenes I-V de CIENCIA no queda sino un número muy reducido de ejemplares, por lo que no se venden números ni volúmenes sueltos.

Los volúmenes sueltos VI (1964) a XXVII (1972), valen cada uno $ 150.00 m/n ($ 15.00 US Cy.).

Los números sueltos valen $ 30.00m/n ($ 3.00 US Cy.).

PUBLICACION TRIMESTRAL DEL PATRONATO DE CIENCIA DE MEXICO CON LA AYUDA ECONOMICA DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

Impreso en la Editorial Galache, S. A., México 7, D. F.
Publicada desde 1940.
Dirección General de Derechos del autor. Licitud Oficio núm. 90, Exp. CC FRI/68 de 30 de enero de 1968.
Reservados todos los derechos por la Revista Ciencia de México.
Se prohibe la publicación parcial o total sin autorización escrita.

Sus cartas serán oportunas si utiliza el servicio de entrega inmediata.